

**Einfluss der interzellulären Kommunikation
durch Gap Junction Kanäle auf
strahlungsinduzierte Bystander Effekte**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Ferya Banaz-Yaşar
aus Kütahya
Oktober 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen und der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Winterhager
2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: HD Dr. Bettina Siebers

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 2007

Meinem Sohn Melih Mustafa

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Frau Prof. Dr. Elke Winterhager für die Betreuung dieser Doktorarbeit und die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut für Anatomie der Universität Duisburg-Essen bedanken.

Prof. Dr. George Iliakis danke ich für die gute Kooperation und für die Möglichkeit Röntgenbestrahlungen durchzuführen.

Dr. Alexandra Gellhaus danke ich herzlich für die gute Betreuung dieser Arbeit und die aufbauenden Gespräche.

Dr. Klaus Greif danke ich für die kollegiale Unterstützung an der PTB, so dass ich die langen und sehr anstrengenden Strahlzeiten fernab von Essen gut überstanden habe. Zudem danke ich ihm für den Einsatz bei der komplizierten Auswertung der ellenlangen Datensätze.

Dr. Klaus Lennartz danke ich bei der Hilfe zur Durchführung der FACS-Analysen und der Zellsortierungen.

Dr. Isabella Gashaw gilt mein Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei diversen Fragen und ihre motivierenden Gespräche.

Sabine Fiernhaber, Tina Schäfer und Betina van Fürden danke ich für die nette, kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Winterhager. Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Gabriele Sehn und Eva Kusch.

Tamara Mussfeld danke ich für die Durchführung der Bestrahlungen während meiner Schwangerschaft.

Zuletzt möchte ich meinem Mann Cemal, meinen Eltern Seyyare und Mustafa und meinen Schwestern für die seelische Unterstützung danken. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht das geworden, was sie ist.

Diese Arbeit wurde von der Europäischen Union (FIGH-CT-2002-00218) gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gap Junctions	1
1.1.1	Aufbau und Struktur von Gap Junctions	1
1.1.2	Funktion von Gap Junctions	3
1.2	Arten und Wirkung ionisierender Strahlung.....	4
1.2.1	Bestrahlung von Einzelzellen mit der Mikrostrahlanlage.....	6
1.3	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte	7
1.3.1	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte über Gap Junctions	8
1.3.2	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte über parakrine Mechanismen.....	9
1.3.3	Markergene für strahlungsinduzierte Bystander Effekte	10
1.3.3.1	Das Tumorsuppressorprotein p53	10
1.3.3.2	Der Zellzyklusinhibitor p21	12
1.3.3.3	Aktivierte Caspase 3	13
2	Zielsetzung der Arbeit.....	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
3.2	Kits	18
3.3	Häufig verwendete Lösungen, Puffer und Medien	18
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	20
3.4.1	RNA	20
3.4.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	20
3.4.1.2	Konzentrationsbestimmung von RNA	21
3.4.1.3	Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarose-Gelen	21
3.4.1.4	Northern Blot Analyse	21
3.4.2	Proteine	22
3.4.2.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellen	22
3.4.2.2	Fällung von Proteinen	23
3.4.2.3	Western-Blot-Analyse	23
3.4.2.4	Verwendete Antikörper	24
3.5	Zellbiologische Methoden	25

3.5.1	Zelllinien und Zellkulturmedien.....	25
3.5.2	Kultivierungsbedingungen.....	26
3.5.3	Lagerung eukaryontischer Zellen.....	26
3.7	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS).....	27
3.7.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	27
3.7.2	Quantifizierung der interzellulären Kopplung über Gap Junctions mittels Farbstofftransfer mit Hilfe von FACS-Analysen	28
3.7.3	Kokultorexperimente zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten.....	30
3.8	Immunhistochemie	32
3.8.1	Antikörper	32
3.8.2	Indirekte Immunzytochemie mit Fluoreszenzmarkierung	32
3.9	Bestrahlung.....	33
3.9.1	Bestrahlung mit Röntgenstrahlen.....	33
3.9.2	Die Ionenbeschleunigeranlage der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB).....	33
3.10	Aufbau der Ionenbeschleunigeranlage der PTB	33
3.10.1	Vorbereitung der Zellen für Einzelzellbestrahlungen mit dem Mikroionenstrahl.....	35
3.11	Quantitative Auswertung der p53 Protein Expression nach Bestrahlung mit dem Mikroionenstrahl	37
3.12	Statistische Auswertungen.....	38
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Einfluss von 5 Gy Röntgenstrahlung auf die Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien.....	39
4.1.1	Analyse der Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien	40
4.1.2	Analyse der Cx43 Expression in bEnd3 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen	42
4.1.3	Analyse der Cx43 Expression in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen	45
4.1.4	Analyse der Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Tansfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy	47

4.2	Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Expression von p53, p21 und Caspase 3.....	49
4.2.1	Expression von p53 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung	51
4.2.2	Expression von p21 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung	54
4.2.3	Expression der aktivierten Caspase 3 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung	56
4.3	Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in Kokulturversuchen mit bestrahlten und unbestrahlten Jeg3 Zelllinien nach Röntgenbestrahlung	58
4.3.1	Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in kokultivierten parentalen Jeg3 Zellen.....	59
4.3.2	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte in Abhängigkeit von der Cx43 Expression.....	61
4.3.3	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte in Abhängigkeit von der Cx26 Expression.....	63
4.4	Untersuchung von Bystander Effekten nach Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen	66
4.4.1	Etablierung der Kultivierungsbedingungen auf Bestrahlungsträgern zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen	67
4.4.2	Etablierung der Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen und nachfolgender p53 Immunzytochemie	68
4.4.3	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen von parentalen Jeg3 Zellen	69
4.4.4	Strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen von Jeg3 Cx43 Transfektanten.....	70
5	Diskussion	73
5.1	Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien.....	74

5.2	Einfluss von Röntgenstrahlen auf die p53, p21 und Caspase 3 Expression in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy	77
5.3	In Jeg3 Zellen sind Bystander Effekte unabhängig von der intrazellulären Kommunikation über Gap Junctions sowie von der Connexin Isoform	81
5.4	Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen	85
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Anhang	104
8.1	Lebenslauf	104
8.2	Veröffentlichungen	105
8.3	Vorträge	105
8.4	Posterpräsentationen	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata (zweifach demineralisiertes Wasser)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CT	C-terminale Domäne
Cx	Connexin
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
et al.	und andere („et alii“)
FACS	fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometrie
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
h, min, sec	Stunde, Minute, Sekunde
hCG	Choriongonadotropin

HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Mol/Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm ($=10^{-3}\text{g}$)
μg	Mikrogramm ($=10^{-6}\text{g}$)
Mg^{2+}	Magnesiumionen
ml	Milliliter ($=10^{-3}\text{l}$)
μl	Mikroliter ($=10^{-6}\text{l}$)
mM	Millimol/Liter
mmol	Millimol ($=10^{-3}\text{mol}$)
MEM	<i>Minimum essential medium</i>
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MOPS	Morpholinopropan-Sulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> (Boten)-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
n.b.	nicht beschrieben
NO	Stickstoffmonoxid
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i>
NT	N-terminale Region
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR
rtTA	reverse transkriptionale Transaktivator
SDS	Sodiumdodecylsulfat

Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Trypsin/EDTA
Tet	Tetrazyklin
TRIS	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
w/v	Gewichtsprozent
WISP	<i>Wnt-1-induced secreted protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Eine Grundvoraussetzung für die Ausbildung und Funktion mehrzelliger Gewebe stellen Zellverbindungen dar. Neben der Kommunikation von Einzelzellen eines Organismus, werden mechanische Stabilität und spezifische Interaktionen zwischen Zellen über direkte Zell-Zellverbindungen vermittelt. Es gibt drei Gruppen von Zell-Zellverbindungen: Abschlussverbindungen (Tight Junctions/Zonula occludens), Haftverbindungen oder auch Adhäsionsverbindungen (Adhaerens Junctions/Zonula adhaerens und Desmosomen/Macula adhaerens) und kommunizierende Verbindungen (Gap Junction). Tight Junctions erzeugen eine Diffusionsbarriere zwischen Zellen. Zonula adhaerens haben die Funktion das Zytoskelett über Zellgrenzen zu verbinden, so dass dem Gewebe Stabilität verliehen wird und schließlich Gap Junctions, welche im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1 Gap Junctions

Gap Junctions sind intrazelluläre Zellverbindungen, die von der Embryogenese bis zur Koordination in adulten Geweben eine wesentliche Rolle spielen. Gap Junctions bilden Cluster von interzellulären Kanälen, den Gap Junction Plaques, die den direkten Austausch von Ionen, sekundären Botenstoffen wie Kalzium (Ca^{2+} -Ionen), zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Metaboliten (Glukose, Aminosäuren, Nukleotide) bis zu einem Molekulargewicht von 1 kDa zwischen benachbarten Zellen gewährleisten (Niessen et al., 2000). Aufgrund dieser Fähigkeit spielen Gap Junctions eine wichtige Rolle bei der Homöostase in Geweben und erfüllen vielfältige physiologische Funktionen.

1.1.1 Aufbau und Struktur von Gap Junctions

Die Struktur von Gap Junctions ist weitgehend aufgeklärt. Jede Zelle stellt jeweils Halbkanäle (Connexone) zur Verfügung, die aneinander andocken und gemeinsam den vollständigen Kanal bilden (Abb. 1A). Ein Connexon hat einen Durchmesser von ca. 7-8 nm und ragt 1 nm über die Zellmembran in den Interzellularraum hinein (Kumar und Gilula, 1996). Jeder Halbkanal ist ein Hexamer aus konzentrisch angeordneten Connexin-Proteinen. Das Connexon ist in der Aufsicht rosettenförmig angeordnet und umgibt eine zentrale wassergefüllte

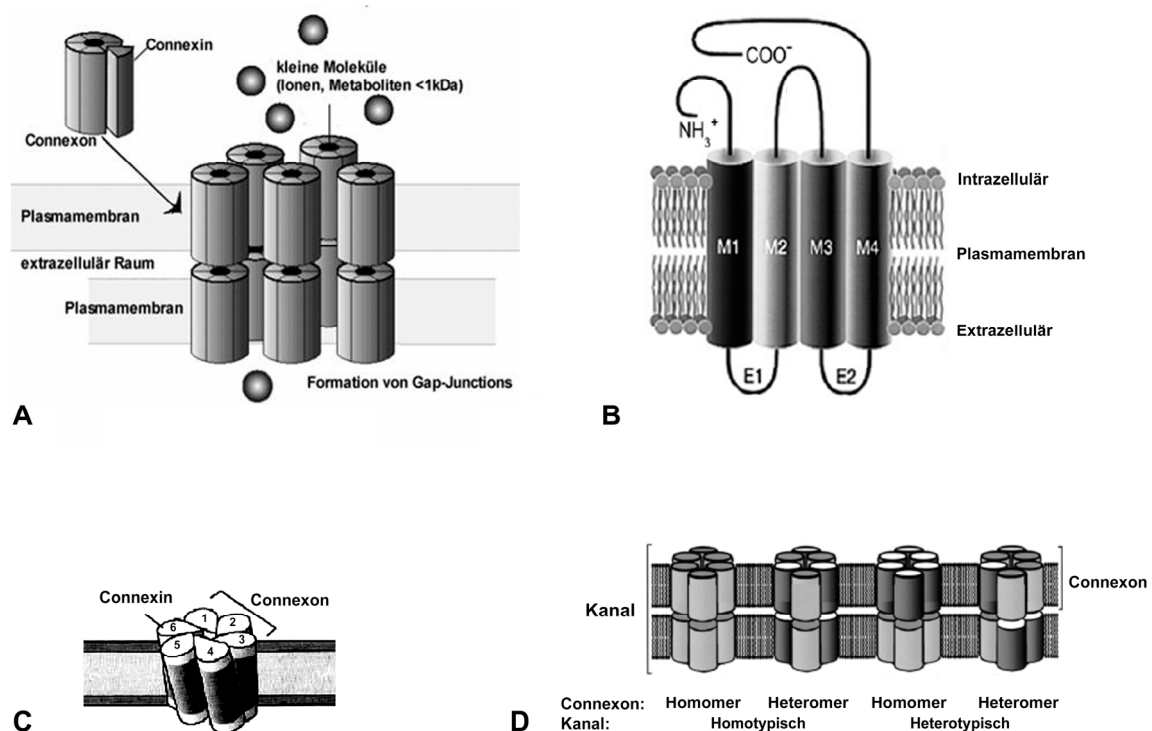


Abb. 1: Aufbau und Struktur von Gap Junctions. (A) (C) Gap Junctions sind Cluster von interzellulären Kanälen. Ein Kanal besteht aus zwei Halbkanälen (Connexone), die hexamere Strukturen von Proteinuntereinheiten, den Connexinen, sind. (B) Topologie eines Connexin Proteins mit vier Transmembrandomänen (M1-M4), zwei extrazellulären Schleifen (E1 und E2), und drei intrazellulären Regionen (N-Terminus (NH_3^+), C-Terminus (COO^-)). (D) Schematische Darstellung der möglichen Zusammensetzung von Connexonen und Gap Junction Kanälen. (Modifiziert nach Sohl und Willecke, 2004).

Pore (Goodenough, 1975).

Im geöffneten Zustand beträgt der Durchmesser eines Gap Junction Kanals 1 – 1,5 nm (Caspar et al., 1977; Loewenstein, 1981; Makowski et al., 1977). Strukturanalysen ergaben, dass jedes Connexin vier transmembrane Domänen, eine zytoplasmatische Schleife, einen N- und C-Terminus, sowie zwei extrazelluläre Schleifen besitzt (Kumar und Gilula, 1996) (Abb. 1B).

Die Interaktion der gegenüberliegenden Connexone wird über die extrazellulären Schleifen vermittelt. Die hydrophoben, α -helikalen Transmembrandomänen werden durch drei hydrophile Schleifen (zwei extrazelluläre Schleifen und eine zytoplasmatische Schleife) verbunden. Der kurze N-Terminus und der längere C-Terminus sind ebenfalls hydrophil (Paul, 1986). Die zwei extrazellulären Schleifen, die Transmembrandomänen und der N-Terminus weisen die größten Sequenzhomologien auf. Eine homologe Kopplung ist eine Kopplung zwischen

homomeren Connexonen (Abb. 1C). Von heteromerer Kopplung wird gesprochen, wenn zwei unterschiedliche Connexone einen Gap Junction Kanal bilden (Jiang und Goodenough, 1996).

Gap Junctions kommen mit Ausnahme von Erythrozyten, Thrombozyten, Spermien und ausdifferenzierten Skelettmuskelzellen in nahezu allen Zellen des Vertebratensystems vor (Evans und Martin, 2002).

1.1.2 Funktion von Gap Junctions

Die Funktionen der Connexin Kanäle können wie folgt zusammengefasst werden: Koordination von Migration, Kontraktion und Sekretion von Stoffen kommunizierender Zellen, interzelluläre Regulation des *second messenger* Spiegels sowie interzellulärer Transport von Ionen und Metaboliten (Evans und Martin, 2002). Gap Junction Kanäle können durch Phosphorylierung (Saez et al., 1998) und durch Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen verschlossen werden (Peracchia et al., 2000).

In neuronalen Geweben dienen Gap Junctions einer schnellen Reizweiterleitung (Zoidl und Dermietzel, 2002), sowie der Synchronisation von Neuronen (Landisman et al., 2002). Im Herzen gewährleisten Gap Junction Kanäle die synchrone Kontraktion des Arbeitsmyokards (Gros und Jongsma, 1996; Severs et al., 2004). Während der Geburt dienen sie zur Kontraktion des Myometriums (Orsino et al., 1996).

Gap Junction Kanäle variieren in ihrer Permeabilität (Qu und Dahl, 2002) und Einzelkanalleitfähigkeit (Suchyna et al., 1999). Die Unterschiede zwischen den Connexinen basieren vor allem in der Länge und in der Aminosäuresequenz des freien zytoplasmatischen C-Terminus. Der C-Terminus kann mit verschiedenen Proteinen interagieren (Evans und Martin, 2002). Beispielsweise interagiert der C-Terminus von Cx43 mit ZO-1 (Toyofuku et al., 1998), mit α - und β -Tubulin (Giepmans et al., 2001a; Giepmans et al., 2001b) und mit dem Wachstumsregulator NOV (Gellhaus et al., 2004) sowie mit c-Src (Giepmans et al., 2001b). Es konnte gezeigt werden, dass bei Gap Junctions neben der Kanalpore auch das Protein selbst eine Funktion in der Signaltransduktion besitzt (Ai et al., 2000). Derzeit sind 20 verschiedene Connexin Isoformen im Maus-Genom und 21 Isoformen im humanen Genom bekannt (Sohl und Willecke, 2004) (Tab. 1). Die Connexin Isoformen werden nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht bezeichnet. Studien an Connexin defizienten Mäusen zeigten,

Connexin	Hauptgewebe- bzw. Zellvorkommen	Phänotyp der Cx-defizienten Maus
Cx23	n. b.	n. b.
Cx26	Leber, Gehirn, Plazenta, Haut, Innenohr	Letaler Plazentadefekt
Cx29	Myelinisierte Zellen (ZNS, PNS), Ischiasnerv, Cochlea	keine funktionelle Störung
Cx30	Haut, Gehirn, Innenohr	Hörschwäche
Cx30.2	n. b.	n. b.
Cx30.3	Haut	n. b.
Cx31	Haut, Plazenta	Transiente plazentare Dysmorphogenese
Cx31.1	Haut	n. b.
Cx32	Leber, Schwannzellen, Niere, Oligodendrozyten	Verminderter Glykogenabbau, erhöhte Leberkarzinogenese
Cx33	Hoden	n. b.
Cx36	Gehirn, Retina	Optische Defizite
Cx37	Endothel, Lunge, Ovar	Weibliche Sterilität
Cx39	n. b.	n. b.
Cx40	Herz, Endothel, Lunge	Atriale Arrhythmie
Cx43	ubiquitär: Herz, Gehirn, Haut, Uterus, Hoden usw.	Fehlbildung am Herzen
Cx45	Herz, Endothel, Neurone	Embryonale Letalität
Cx46	Augenlinse	Zonularer nukleärer Katarakt
Cx47	Gehirn, Rückenmark	Störungen im ZNS
Cx50	Augenlinse	Mikrophthalmie, Zonularer und pulverulenter Katarakt
Cx57	Haut, Herz, Niere, Ovar	n. b.

Tab. 1: Die murine Connexin Multigenfamilie. Zusammenstellung der bisher bekannten Gene mit ihrem Expressionsmuster und dem Phänotyp der Knockout Maus. (nach Evans und Martin, 2002, Eiberger et al., 2006)

dass die einzelnen Connexin-Isoformen unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Geweben aufweisen (Tab. 1). Es werden zudem immer mehr Mutationen im humanen Connexin-Genom entdeckt, die zum Teil schwerwiegende Erbkrankheiten auslösen. Beispielsweise führt die homozygote Inaktivierung von Cx46 bzw. Cx50 beim Menschen und bei der Maus zu Katarakten der Linse (Gong et al., 1999; Mackay et al., 1999; Pal et al., 1999; White et al., 1998).

Mutationen bzw. eine Inaktivierung des Cx26 Kanals führt bei der Maus zur Taubheit (Cohen-Salmon et al., 2002), wohingegen der Verlust des Cx30 Kanals beim Menschen zu einer Hörschwäche führt (Teubner et al., 2003). Die häufigsten Ursachen für nicht-syndromale Taubheit beim Menschen sind Mutationen im Cx26- bzw. Cx30-Gen (Kelley et al., 1999; Kelsell et al., 1997).

1.2 Arten und Wirkung ionisierender Strahlung

Es wird diskutiert, ob Gap Junction Kanäle strahlungsinduzierte Bystander Effekte vermitteln können. Seit der Entdeckung der nach ihm benannten Strahlen durch Wilhelm Conrad Röntgen im Jahr 1895 sind verschiedene Arten von ionisierender

Strahlung bekannt. Ionisierende Strahlung besteht aus geladenen Teilchen (α , β^+ , β^- , Elektronen, Protonen), die wegen ihrer Ladung beim Durchgang durch Materie direkt mit den Atomen in Wechselwirkung treten. Es gibt verschiedene Typen von geladenen Teilchen. Mit α -Strahlung bezeichnet man einen Teilchenstrom aus Heliumkernen. Da im Abstand von wenigen Zentimetern die Heliumkerne vollständig von der Luft absorbiert werden, kann schon bereits Plexiglas die eigentlich gefährlichen α -Strahlen abschirmen (*high LET = linear energy transfer*). α -Strahlung kann nicht durch die Haut durchdringen. Mit β -Strahlung bezeichnet man einen Teilchenstrom aus sehr energiereichen, d.h. schnellen Elektronen. Um sich vor dieser Strahlung zu schützen, wird die Strahlung mit absorbierenden Materialien abgeschirmt. β -Strahlung kann Weichteilgewebe bis zu wenigen mm durchdringen. γ - bzw. Röntgenstrahlung entsteht durch den Zerfall von Atomkernen. γ -Strahlung ist die Strahlung mit dem größten Durchdringungsvermögen von Materie (*low LET*). Da diese Strahlung schwer abzuschirmen ist, ist der Umgang mit ihr sehr gefährlich. Zum Schutz vor Umgang mit γ -Strahlung werden dicke Bleiplatten verwendet. Eine weitere Strahlungsart sind Neutronenstrahlen. Sie entstehen durch Kernspaltung von schweren Atomkernen z.B. Uran. Sie werden hauptsächlich in Kernreaktoren und für die Behandlung von Tumorpatienten verwendet.

Zur Abschätzung von Strahlenrisiken und die Ermittlung von Dosis-Wirkungsbeziehungen im Bereich kleiner Dosen sind Kenntnisse über die molekularen und zellulären Wirkungsmechanismen durch ionisierende Strahlung von zentraler Bedeutung. Ionisierende Strahlung findet vor allem in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen ihre Anwendung (Osterreicher et al., 2003). Ca. 50 % aller Tumorpatienten erhalten im Verlauf ihrer Erkrankung eine strahlentherapeutische Behandlung. Um möglichst genaue Vorhersagen über den Erfolg bzw. das Risiko der Strahlentherapie für den einzelnen Patienten treffen zu können, müssen die molekularen Mechanismen der zellulären Strahlenwirkung aufgeklärt werden. Nach Bestrahlung können Zellschäden direkt oder indirekt induziert werden. Die direkte Induktion der Schäden beruht auf Interaktionen von Partikeln oder Photonen mit DNA. Indirekte Induktionen von Zellschäden werden meist durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst, die in Zellen DNA-Schäden hervorrufen (Hall, 2003). Die meisten Strahlenschäden entstehen durch die Schädigung der DNA, wobei 99,9% der Strahlenschäden durch zelleigene

Enzyme wieder repariert werden (Jung et al., 1998). Nach ionisierender Bestrahlung reagieren Zellen mit einem verzögerten oder arretierten Proliferationszyklus zur Reparatur von DNA-Schäden (Kastan and Bartek, 2004; Kastan et al., 1992). Bei nicht- bzw. falschreparierten DNA-Schäden wird eine lokale Kontrolle durch Inaktivierung der Teilungsfähigkeit (mitotischer Zelltod), Zellzyklusarrest oder durch Apoptose über das Tumorwachstum erzielt. Darüber hinaus können benachbarte, nicht bestrahlte Zellen Schäden vorweisen (Mothersill und Seymour, 1997a). Dieser Effekt wird **Bystander Effekt** genannt (s. Kap. 1.3). Strahlung wird in direkte und indirekte Strahlenwirkung unterteilt. Bei der direkten Strahlenwirkung wird durch die Ionisierung eine Zerstörung biologischer Moleküle selbst (DNA-Strangbrüche, Schädigung der Zellmembran) ausgelöst. Bei der indirekten Strahlenwirkung werden umgebende Moleküle (z.B. Wasser bzw. Nährmedium) zu hochreaktiven Radikalen ionisiert, die schließlich das Zielmolekül schädigen (Kiefer, 1993). Ionisierende Strahlung entstammt natürlichen und künstlichen Quellen. Eine natürliche Quelle ionisierender Strahlen ist zum einen die kosmische Strahlung, die aus dem Weltall auf die Atmosphäre trifft und zum anderen die terrestrische Strahlung, die beim radioaktiven Zerfall natürlicher Substanzen der Erdrinde entsteht (zum Beispiel bei Radon-Isotopen).

1.2.1 Bestrahlung von Einzelzellen mit der Mikrostrahlanlage

Im Gegensatz zu herkömmlichen Bestrahlungstechniken erlauben Mikrostrahlanlagen die Bestrahlung einzelner Zellen aus einem Zellverband. Die erst seit den 90er Jahren im Routinebetrieb durchgeführten Mikrostrahlexperimente haben den Vorteil, dass die Wirkung von Bestrahlung möglichst genau kontrolliert werden kann (Folkard et al., 1997b). Zudem ermöglicht die Einzelzellbestrahlung die Analyse von Effekten in einzelnen Zellen und in benachbarten, unbestrahlten Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bestrahlung von einer einzigen Zelle strahlungsinduzierte Bystander Effekte auslösen kann (Brenner et al., 2001). Die Bestrahlung mit einer Mikrostrahlanlage ermöglicht neben der Kontrolle der Anzahl der Teilchen und der Energiedosis, die genaue Position und den Trefferzeitpunkt der Bestrahlung von einzelnen, lebenden Zellen. Das führt zum besseren Verständnis der zellulären und molekularen Effekte ionisierender Strahlung. Zudem kann die Strahlenbelastung jeder einzelnen Zelle genau auf ein Teilchen eingestellt werden. So konnte z.B. durch die gezielte Bestrahlung der DNA selbst bei dem Durchgang eines

einzelnen α -Teilchens eine signifikante Zellantwort experimentell nachgewiesen werden (Gerardi et al., 2005). Durch die zielgenaue Bestrahlung des Zellkerns und somit der DNA können biologische Wirkungen untersucht werden. Zudem ist die Bestrahlung des Zytoplasmas oder nur des Nährmediums mit der Mikrostrahlanlage möglich (Wu et al., 1999).

Im Gegensatz zu herkömmlichen Bestrahlungstechniken erlauben es Mikrostrahlexperimente auch, den Einfluss der Zeitstruktur der Ionisationsereignisse zu untersuchen, da es möglich ist, die zeitliche Abfolge der Teilchen, die eine bestimmtes Zellkompartiment treffen, festzulegen und zu variieren. Zudem ermöglichen Mikrostrahlexperimente die Zusammenhänge zwischen den physikalischen Primäreffekten der verschiedenen Strahlenarten und den ausgelösten biologischen Reaktionen genauer als bisher zu untersuchen.

1.3 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte

Als Bystander Effekte werden strahleninduzierte Effekte von nicht direkt bestrahlten Zellen bezeichnet (Nagasawa et al., 1992). Der strahlungsinduzierte Bystander Effekt wurde erstmalig bei Patienten nach einer Strahlentherapie beobachtet, die Veränderungen in unbestrahlten Organen vorwiesen (Parsons et al., 1954). Es konnte gezeigt werden, dass es Wechselwirkungen zwischen bestrahlten und benachbarten, unbestrahlten Zellen gibt, die dazu führten, dass auch die unbestrahlten Zellen vergleichbare Strahlenschäden wie die bestrahlten zeigten. Ein typisches Beispiel dafür ist das Experiment von Nagasawa und Little (Nagasawa und Little, 1999), in dem eine Zellpopulation mit einer konventionellen Alpha-Quelle so bestrahlt wurde, dass statistisch weniger als 1% der Zellen von einem Teilchen durchdrungen wurden und trotzdem mehr als 30% der Zellen einen erhöhten Grad an DNA-Schäden zeigten. Obwohl die Mechanismen des Bystander Effektes noch weitgehend ungeklärt sind, werden als Mediatoren sowohl lösliche Faktoren (Zytokine und unbekannte Faktoren) als auch freie Radikale (reactive oxygen species, ROS) diskutiert. Diese löslichen Faktoren können durch passive Diffusion nach ihrer Exkretion in den Interzellularraum oder durch direkten Transport über Gap Junctions von direkt bestrahlten zu unbestrahlten Nachbarzellen gelangen. Da die Mechanismen des strahlungsinduzierten Bystander Effektes nur zum Teil verstanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl direkte Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junction Kanäle (Azzam et al., 2001; Mitchell et al., 2004b; Nagasawa et al.,

2002) als auch lösliche Faktoren, die von bestrahlten Zellen sezerniert werden (Iyer et al., 2000; Lehnert et al., 1997; Mothersill und Seymour, 1998; Prise et al., 1998) an der Weitergabe von Bystander Effekten beteiligt sind.

Aus der Literatur sind verschiedene Auswirkungen des Bystander Effektes bekannt. Sie können verschiedenste Veränderungen in unbestrahlten Zellen auslösen wie Inaktivierung von nicht bestrahlten Zellen (Mothersill und Seymour, 1997b; Sawant et al., 2002), die Induktion von Schwesterchromatidaustausch (Deshpande et al., 1996; Lehnert et al., 1997; Nagasawa und Little, 1992), Chromosomenaberrationen (Littlefield et al., 1969), die Induktion von Gen-Mutationen (Nagasawa und Little, 1999; Zhou et al., 2000), neoplastische Zelltransformation (Mitchell et al., 2004a; Sawant et al., 2001), Veränderungen in der Genexpression (Hickman et al., 1994), eine Zunahme an ROS (Azzam et al., 2002; Bishayee et al., 2001; Lehnert et al., 1997; Narayanan et al., 1997), Abnahme sowie Zunahme der zellulären Klonogenität und der Strahlenempfindlichkeit (Iyer et al., 2000; Mothersill und Seymour, 1997b). Bereits 30 min nach Bestrahlung sind erste Bystander Effekte zu beobachten, die bis zu 60 h nach Bestrahlung nachweisbar sind. Die Strahlungs-dosis bei der Bystander Effekte ausgelöst werden, liegt zwischen 0,25 mGy bis 10 Gy (Hall, 2003).

Die Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten kann durch mehrere Parameter, sowie durch die verwendete Methode beeinflusst werden. Neben dem Zelltyp (Mothersill und Seymour, 1997b) und der Strahlungsart ist auch die Strahlungs-dosis (Iyer und Lehnert, 2002a; Iyer und Lehnert, 2002b) für den Bystander Effekt von entscheidender Bedeutung.

1.3.1 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte über Gap Junctions

Es ist bekannt, dass durch die Kommunikation über Gap Junction Kanäle Informationen von direkt bestrahlten auf unbestrahlte Zellen weitergeleitet werden können (Azzam et al., 1998; Bishayee et al., 2001). Dabei spielt vor allem die Kommunikation über Cx43 Kanäle eine wichtige Rolle (Azzam et al., 2001; Azzam et al., 2003a).

Die Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten über Gap Junction Kanäle wurde erstmals in der Krebsbehandlung mit Ganciclovir beobachtet. Mesnil et al. fanden heraus, dass Tumorzellen, die mit HSV-tk (*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase*) transfiziert wurden, in benachbarten untransfizierten Zellen Zelltod auslösen konnten. Dabei wurde festgestellt, dass das nicht toxische

Ganciclovir durch HSV-tk in eine toxische Substanz umgewandelt wurde. Das toxische, phosphorylierte Ganciclovir wurde nur über Gap Junction Kanäle an benachbarte Zellen weitergegeben (Mesnil und Yamasaki, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass für einige Zelllinien über Gap Junctions mehr strahlungsinduzierte Effekte nach Bestrahlung ausgelöst wurden, als über den Transfer von Medium (Mitchell et al., 2004b). Mediumtransferversuche beruhen darauf, dass nach Bestrahlung der Zellen, unbestrahlte Zellen mit dem Medium der bestrahlten Zellen inkubiert werden. Azzam et al. konnten zeigen, dass in konfluenten humanen Fibroblasten, die nur zum Teil mit α -Teilchen bestrahlt wurden, gehäuft neben DNA-Schäden auch eine Hochregulation der Proteine p53 und p21 auftraten (Agarwal et al., 1995; Azzam et al., 1998; Kastan et al., 1991). Zudem konnte dieser Effekt durch den Einsatz von Lindan, einem Gap Junction Kanal Inhibitor, in bestrahlten Zellen inhibiert werden. Dies war ein weiterer Beweis, dass der strahlungsinduzierte Bystander Effekt durch Gap Junction Kanäle, und speziell über Cx43 Kanäle, weitergegeben wird (Azzam et al., 2001). In einer weiteren Publikation von Azzam et al. konnte in Connexin Knockout Zellen kein Bystander Effekt gezeigt werden, wohingegen in parentalen Zellen, die Connexin Kanäle bilden ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt nachgewiesen wurde (Azzam et al., 2000).

1.3.2 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte über parakrine Mechanismen

Als Mediatoren für parakrine Mechanismen werden freie Radikale (ROS, NO) und lösliche Faktoren wie Zytokine, TNF (*tumor necrosis factor*), Interleukin 1 und 8 und TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) diskutiert (Iyer et al., 2000; Lehnert et al., 1997; Matsumoto et al., 2001; Morgan, 2003; Narayanan et al., 1997; Shao et al., 2001; Shao et al., 2005; Shao et al., 2002). Dabei wird vermutet, dass durch Bestrahlung freie Radikale durch direkt bestrahlte Zellen in das Medium abgegeben werden, die dann interzelluläre Signalwege in unbestrahlten Zellen auslösen (Chaudhry, 2006; Matsumoto et al., 2001). Die Vermittlung des strahlungsinduzierten Bystander Effektes über parakrine Mechanismen wurde durch Mediumtransfer-Versuche entdeckt. Das Medium der bestrahlten Zellen löste in unbestrahlten Zellen biologische Effekte aus. Lehnert et al. konnten zeigen, dass das Medium von Zellen, die mit α -Teilchen bestrahlt wurden Schwesterchromatidenaustausch in unbestrahlten Zellen auslösten (Goldberg und

Lehnert, 2002; Lehnert et al., 1997). Durch den Einsatz von ROS-Fängern wie Superoxid Dismutase konnte der strahlungsinduzierte Bystander Effekt unterdrückt werden. Somit konnte eine Beteiligung von ROS bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten bewiesen werden (Narayanan et al., 1997). Die Beteiligung von TGF- β 1 bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten konnte von Iyer et al. bewiesen werden (Iyer und Lehnert, 2000). In Experimenten zeigten sie, dass der Bystander Effekt nach Wegfangen von TGF- β 1 durch Superoxid Dismutase und Katalase unterdrückt werden konnte. Das Medium von mit γ -Strahlung bestrahlten Keratinozyten (HaCaT Zellen) verringerte in unbestrahlten Zellen die Koloniebildung und induzierte Apoptose (Mothersill und Seymour, 1997b).

1.3.3 Markergene für strahlungsinduzierte Bystander Effekte

Um strahlungsinduzierte Bystander Effekte in unbestrahlten Zellen nachzuweisen, werden verschiedene Endpunkte untersucht. Diese Endpunkte sind Apoptose, Zunahme von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Chromosomenaberration, DNA-Schäden, Mutationen, veränderte Genexpression, γ -H2AX Foci Bildung, Mikronuklei Bildung, genomische Instabilität oder neoplastische Transformation (Goldberg und Lehnert, 2002). Zudem werden mit Hilfe der Immunzytochemie die Expression von γ -H2AX Foci, Bildung von Mikronuklei, p53 und p21 Expression nach Bestrahlung analysiert.

In dieser Arbeit wurden die zellulären Stressmarker p53, p21 und das Apoptosegen Caspase 3 für die Erforschung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten ausgewählt.

1.3.3.1 Das Tumorsuppressorprotein p53

Im Prozess der Tumorentwicklung spielt der Tumorsuppressor p53 eine zentrale Rolle. In rund 60% aller humanen Tumore weist das p53 Tumorsuppressorgen Mutationen auf und ist somit das am häufigste veränderte Gen in Tumoren (Greenblatt et al., 1994). p53 hat vielfältige Aufgaben, die alle dazu dienen, die genetische Integrität einer Zelle bzw. des gesamten Organismus zu schützen. p53 ist ein multifunktionelles Protein. Zwei Funktionen werden von p53 ausgeführt: die Induktion des Zellzyklusarrests und die Aktivierung des apoptotischen Zelltods.

Die Aktivierung von p53 kann zu verschiedenen Antworten in Zellen führen, wie Differenzierung, Alterung, DNA-Reparatur und Inhibierung der Angiogenese

(Vogelstein et al., 2000). Die p53 vermittelte Induktion des Zellzyklusarrests (von G1 nach S oder von G2 nach M) (Agarwal et al., 1995) und die Induktion des p53 vermittelten apoptotischen Zelltods erlauben p53 das Wachstum gestresster Zellen zu kontrollieren (Bates und Vousden, 1999). Zum Schutz der Zelle vor Tumorentstehung arretiert die Zelle entweder im Zellzyklusarrest oder entfernt Zellen aus einem Organismus durch Apoptose (Polyak et al., 1997). Der Zellzyklusarrest, dient der Durchführung von DNA-Reparatur und kann irreversibel oder transient sein. Durch die p53 induzierte Apoptose wird die Expression verschiedener Proteine angetriggert, wie z.B. von p21 (Vousden, 2000).

Die Aktivierung von p53 kann über direkte Schädigungen der DNA, z. B. durch ionisierende Strahlung (Coutts und La Thangue, 2006; Cuddihy und Bristow, 2004; Reagan-Shaw et al., 2006), durch Schädigungen von Komponenten, die für die Kontrolle und Verteilung des zellulären genetischen Materials notwendig sind (mitotischer Spindelapparat) Hitzeschock oder Hypoxie (Cross et al., 1995; Ohnishi et al., 1996), durch NO-Exposition (Forrester et al., 1996) oder durch verschiedene Onkogene, wie Myc, Ras und E1A, ausgelöst werden (Abb. 2B) (Cross et al., 1995; de Stanchina et al., 1998; Forrester et al., 1996; Graeber et al., 1996; Linke et al., 1996; Ohnishi et al., 1996).

p53 befindet sich zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus häufig im Zytoplasma (Shaulsky et al., 1990). Stress führt zur nukleären Akkumulation von p53 im Kern wo es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt (Tao und Levine, 1999; Zhang und Xiong, 2001). Die Aktivierung von p53 erfolgt nach Zellschädigung durch Proteinkinasen, die p53 phosphorylieren, so dass die Transkription mehrerer Gene, wie z.B. p21 angetriggert werden (Agarwal et al., 1995).

Das p53 Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert und besitzt 11 Exons (Lane, 1992) (Abb. 2A). Das Protein hat eine Größe von 53 kDa. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus 393 (humanes p53) bzw. 387 (murines p53) Aminosäuren aufgebaut ist. Es besteht aus drei funktionellen Domänen: die N-terminale Transaktivierungsdomäne, die zentrale Domäne und die C-terminale Domäne (Fields und Jang, 1990). Im N-Terminus enthält p53 eine saure Transaktivator-Domäne (AS 1-42). Die zentrale Domäne vermittelt die sequenzspezifische Bindung von p53 an die DNA. Die Bedeutung der zentralen Domäne für die Tumorsuppressorfunktion von p53 wird auch daran deutlich, dass die Mehrzahl der Mutationen im p53-Gen im Bereich dieser Domäne liegt.

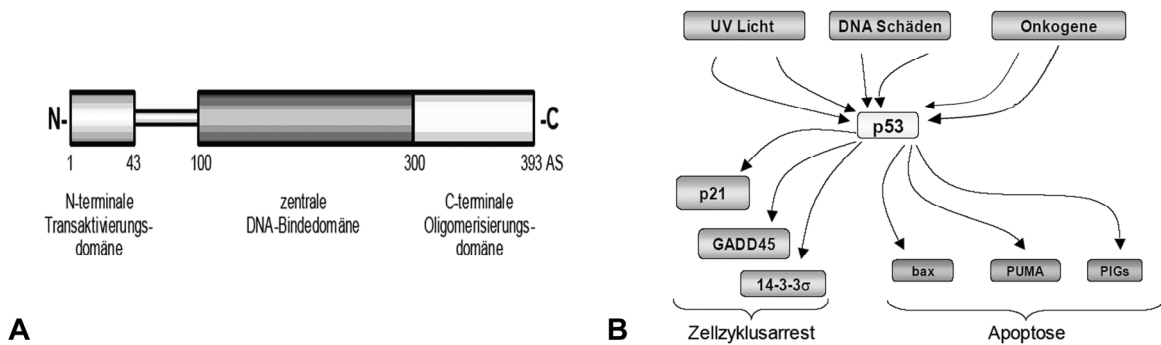


Abb. 2: Struktur und Signalweg des Tumorsuppressorproteins 53. (A) p53 ist ein 53 kDa großes Protein, bei dem mindestens drei Domänen unterschieden werden können: die N-terminale transaktivierende, die zentrale DNA-bindende und die carboxyterminale Oligomerisierungsdomäne. (B) DNA-Schäden, Strahlung oder die Einwirkung von zellulären Onkogenen führen zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53, welches seinerseits einen Zellzyklusarrest bewirkt. Je nach Schwere des vorliegenden Schadens wird entweder die DNA repariert oder die Apoptose eingeleitet (Graphik angelehnt an Vogelstein et al., 2000).

Zusammen mit der zentralen Domäne wird p53 dadurch zu einem sequenzspezifischen Transaktivator, der nach seiner Aktivierung die Transkription verschiedener p53-Zielgene einleiten kann. Der C-Terminus (AS 363-393) besteht aus basischen Aminosäuren und beinhaltet eine Domäne, die an der Regulation der sequenzspezifischen DNA-Bindung beteiligt ist. Er kann Einzelstrang- und Doppelstrang-DNA oder RNA binden und reguliert die Aktivitäten der zentralen Domäne.

1.3.3.2 Der Zellzyklusinhibitor p21

p21 kann neben Proliferation und Zelltod die Differenzierung in Zellen kontrollieren. p21 ist ein Inhibitor der Zellproliferation (Sherr und Roberts, 1995). Das Protein kann auch die Apoptose inhibieren, indem die Zelle im Zellzyklus arretiert (Gartel und Tyner, 2002; Topley et al., 1999).

p21 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 21 kDa. Es gehört zur Cip/Kip Familie der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren. p21 besteht aus einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne (Abb. 3A). Diese Domänen dienen der Bindung an verschiedene Proteine: Cycline, Transkriptionsfaktoren, DNA-Synthese-Initiatoren, Proteinkinasen und Caspasen (Dotto, 2000).

Zu den wichtigsten Funktionen von p21 gehört die Regulierung von Kinasen, Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen. Die Überexpression von p21 führt zu G1- und S-Phase Arrest in der Zelle (Niculescu et al., 1998; Ogryzko et al., 1997).

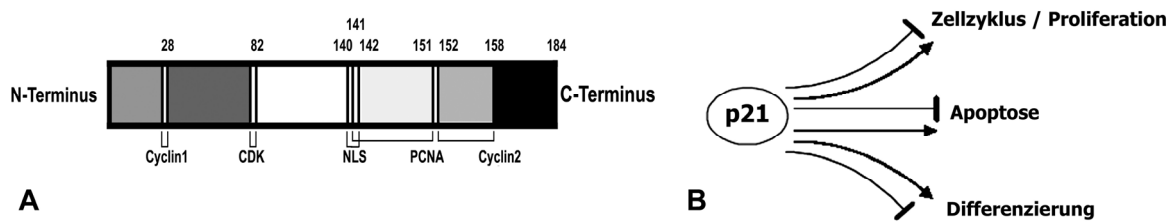


Abb. 3: Struktur und biologische Funktionen von p21. (A) p21 ist ein 21 kDa großes Protein. Es besitzt Bindungsstellen für Cyclin1 (AS 17-24), Cdk (AS 53-58), Cyclin2 (AS 152-158), PCNA (AS 141-151). (B) p21 kann den Zellzyklus und die Proliferation, die Apoptose und die Differenzierung von Zellen sowohl inhibieren als auch aktivieren (Dotto, 2000).

p21 hat eine duale Rolle im Zellzyklus: abhängig von seinem Expressionslevel in der Zelle kann es Cyclin/CDK-Komplexe inhibieren, sowie die Bildung von aktiven Cyclin/CDK4/6-Komplexen fördern und stabilisieren. Dadurch kann p21 den Zellzyklus antriggern (Sherr und Roberts, 1999) und die Proliferation aktivieren. p21 kann auch über einen entweder p53-abhängigen oder p53-unabhängigen Mechanismus als Apoptose Inhibitor wirken (Abb. 3B). Der p53 abhängige Zellzyklusarrest dient vor allem zum Schutz vor ionisierender Strahlung und Chemotherapie. Oft vermittelt dabei ein hoher Expressionslevel von p21 einen Zellzyklusarrest und damit einen Schutz vor p53-abhängiger Apoptose (Gartel und Tyner, 2002). p21 kann sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein (Zhou et al., 2001a).

Der Promoterbereich von p21 beinhaltet zwei konservierte Bindestellen für p53 und ist somit ein Zielgen für p53 (Zhao et al., 2006). Die Expression von p21 wird unter anderem von p53 als Transkriptionsfaktor reguliert. Als Folge von DNA Schäden, z.B. durch ionisierende Strahlung oder chemotherapeutische Behandlung, akkumuliert p53 in der Zelle und führt über die transkriptionelle Aktivierung von p21 zum Zellzyklusarrest in der G1 Phase (Little und Nagasawa, 1985). Dadurch wird die Aktivität der zyklinabhängigen Kinasen inhibiert, so dass die DNA-Reparatur ermöglicht wird oder die Apoptose eingeleitet werden kann (Vogelstein et al., 2000).

1.3.3.3 Aktivierte Caspase 3

Die Caspasen (**C**ysteinyln **A**sparatase-specific **P**roteinases) bilden eine Familie aus asparaginspezifischen proteolytischen Enzymen, die an der biochemischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose beteiligt sind. Die Mehrheit der

Caspasen ist im Zytoplasma lokalisiert. Jedoch sind sie auch an der Kernmembran, im Kern, im Golgi-Apparat (Caspase 12) oder in den Mitochondrien vorzufinden (Caspasen 9, 3 und 2) (Bratton und Cohen, 2001). Caspasen spalten ihre Substrate spezifisch nach Aspartatsäureresten. Sie können autokatalytisch oder innerhalb einer Kaskade untereinander aktiviert werden. Dabei nimmt Caspase 3 eine zentrale Rolle als Effektorcaspase ein, da die Aktivierung der Caspase 3 die Zelle in den Tod führt („*point of no return*“) (Marks et al., 1998).

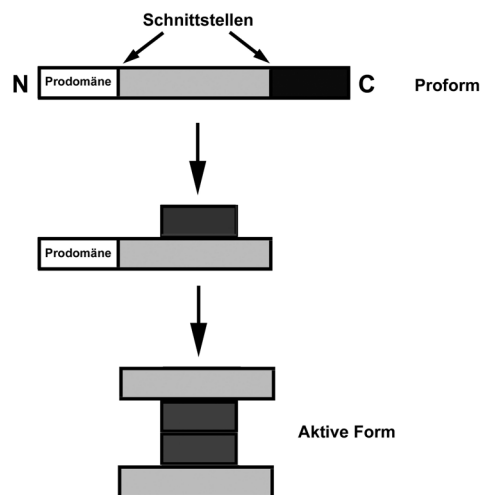


Abb. 4: Proteolytische Aktivierung der Caspasen. Durch Abspaltung der Prodomäne entsteht die aktive Heterotetramerstruktur, bestehend aus zwei großen und kleinen Untereinheiten (Schulze-Osthoff et al., 1998).

Derzeit sind 14 verschiedene Caspasen beim Menschen bekannt. Aufgrund ihrer Funktion werden die Caspasen in Initiator- (Caspase 8, 9 und 10) und Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) unterteilt. Initiatorcaspasen interagieren mit speziellen Adapterproteinen und leiten proapoptotische Stimuli durch Spaltung und Aktivierung untergeordneter Caspasen in der Signalkaskade weiter. Die Aktivierung der Effektorcaspasen führt zum Tod der Zelle. Durch die Aktivierung der Caspase 3 werden zahlreiche Zellstrukturproteine und Reparaturenzyme der DNA abgebaut (z.B. PARP, Lamin B, Histon H1), so dass typische morphologische Merkmale apoptotischer Zellen aktiviert werden (Unterbrechung der Signalübertragung, Inhibition der Genexpression, Arretierung des Zellzyklus, Verlust von DNA-Reparaturfunktionen, Fragmentierung chromosomaler DNA, Abbau nukleärer und zytoplasmatischer Strukturproteine).

Jede Caspase wird in einer inaktivierten Form Zymogen (Procaspase) von 30-35 kDa im Zytoplasma synthetisiert und wird durch Proteolyse in ihre aktive Form

überführt. Die Procaspasen bestehen aus je drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne (ca. 23-216 Aminosäuren), einer großen Untereinheit (ungefähr 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa) (Bredesen, 2000). Die Aktivierung von Caspasen kann entweder über membranständige Todesrezeptoren eingeleitet werden oder durch Granula zytotoxischer T-Zellen und natürlicher Killerzellen sowie durch allgemeinen Zellstress wie Hitze, Zytostatika oder Bestrahlung, die DNA-Schäden, oxidativen Stress und Schädigung der Mitochondrien ausgelöst werden. Bei der Aktivierung wird die Prodomäne abgespalten, so dass sich zwei große und zwei kleine Untereinheiten zu einem stabilen Tetramer zusammenlagern, welcher dann katalytisch aktiv ist (Eldadah und Faden, 2000; Los et al., 1999) (Abb. 4). Die in ihrer Sequenz und Länge variable N-terminale Prodomäne ist an der Regulation der Aktivierung beteiligt (Thornberry, 1997). Caspasen besitzen einerseits die Fähigkeit zur eigenen Prozessierung, können aber auch als Teil einer Kaskade andere Caspasen aktivieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Vermittlung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten von bestrahlten auf unbestrahlte Zellpopulationen untersucht werden. Zudem sollte eine mögliche Beteiligung der interzellulären Kommunikation über Gap Junction Kanäle bei der Vermittlung dieser Bystander Effekte analysiert werden.

Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die humane maligne Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 verwendet, die nachgewiesenermaßen keine Connexine exprimiert und somit kommunikationsdefizient ist (Hellmann et al., 1996). Im Vergleich dazu wurde dieselbe Zelllinie, die stabil mit einem induzierbaren Tet-On-System mit Connexin43 (Cx43) oder Connexin26 (Cx26) transfiziert war, analysiert (Gellhaus et al., 2004).

Da bekannt war, dass Strahlung selber die Connexin Expression in ihrer Stärke modulieren bzw. induzieren kann, sollte zunächst gezeigt werden, welchen Einfluss die Röntgenstrahlen auf die Expression der verwendeten parentalen Jeg3 Zellen und auch auf die mit Cx43 transfizierten Zelllinien hatten. Im Vergleich dazu wurden die endogen Cx43 exprimierenden Maus Endothelzellen bEnd3 und die humanen Endothelzellen EA.hy926 analysiert.

Weiterhin sollte ein adäquater Stressmarker als sensibler Indikator für strahlungsinduzierte Bystander Effekte ermittelt werden. Zu diesem Zweck sollten sowohl die Stressmarker aktiviertes p53 und p21 sowie der Apoptosemarker Caspase 3 untersucht werden.

Strahlungsinduzierte Bystander Effekte und die Rolle der verschiedenen Connexin Isoformen auf die Vermittlung dieses Bystander Effektes sollte an induzierte als auch nicht induzierte Jeg3 Cx43 und Cx26 Transfektanten in einer Kokultur von bestrahlten und unbestrahlten Zellen getestet werden. Da die Kokultur mindestens vier Stunden durchgeführt werden muss, um eine optimale Kopplungsrate zu erhalten (Banaz-Yasar et al., 2005), sollte in Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen durchgeführt werden, um Kurzzeiteffekte von Langzeiteffekten des Bystander Phänomens zu diskriminieren. Dazu sollte das gleiche Zellsystem und der gleiche Stressmarker verwendet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Neben den üblichen Laborchemikalien wurden folgende Chemikalien verwendet:

Agarose	PeqLab (Erlangen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calcein-AM	Molecular Probes (USA)
α - ³² P-dCTP	ICN (Eschwege)
Dil	Molecular Probes (USA)
DMEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
DMSO	Merck (Darmstadt)
Doxyzyklin-Hydrochlorid	Sigma (Taufkirchen)
DTT	Gibco BRL (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Formamid, deionisiert	Sigma (Taufkirchen)
FCS	Gibco BRL (Karlsruhe)
Geneticin (G418-Sulfat)	ICN (Eschwege)
Heringssperma-DNA (DNA MB grade)	Roche (Boehringer, Mannheim)
Hoechst 33342	Sigma (Taufkirchen)
Hybond-N	Amersham Biosciences (Freiburg)
Hybond-P	Amersham Biosciences (Freiburg)
Klenow-Enzym	Roche (Boehringer, Mannheim)
L-Glutamin	Gibco BRL (Karlsruhe)
MEM	Gibco BRL (Karlsruhe)
MOPS	Serva (Heidelberg)
Oligo(dt) ₁₂₋₁₈ Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
PBS Dulbecco	Seromed (Berlin)
Poly-L-Lysin	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL (Karlsruhe)
Puromycin	Sigma (Taufkirchen)

Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Taufkirchen)
RNAse A	QIAGEN (Hilden)
RNAse-Free DNAse Set	QIAGEN (Hilden)
Röntgenfilme: KodakX-AR5	Kodak (Stuttgart)
tetrazyklinfreies FCS	Biochrome (Berlin)
Trypsin/EDTA (1x)	Gibco BRL (Karlsruhe)
Mowiol	Calbiochem (Darmstadt)
Vybrant® Dil cell-labelling solution	Molecular Probes (USA)
Whatman 3MM-Papier	Biometra (Göttingen)
Zellkulturflaschen, -platten	Falcon (Heidelberg)

Alle sonstigen Chemikalien und Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen BioRad (München), Biozym (Hameln), Invitrogen (Groningen, Holland), Roche (Mannheim), Merck (Darmstadt), New England Biolab (Schwalbach/Taunus), Promega (Heidelberg), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

3.2 Kits

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce (USA)
Multiprime DNA Labelling Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN (Hilden)
ECL Plus Western Blotting Detection Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)

3.3 Häufig verwendete Lösungen, Puffer und Medien

Alle Puffer und Lösungen wurden mit A.dest. angesetzt und ggf. autoklaviert oder sterilisiert.

Zusammensetzung der Lösungen für Northern Blot Analysen

MOPS-Puffer (10x)	0,2 M	MOPS
	2 M	NaAc; pH 8,5
	0,5 M	EDTA; pH 7,5
	pH 7,0	mit 10 N NaOH einstellen
20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na ₃ Citrat; pH 7,5

RNA-Hybridisierungslösung	55%	deionisiertes Formamid
	10%	Dextransulfat
	0,8%	SDS
	1 M	NaCl
	10 µg/ml	Heringssperma-DNA
Waschpuffer I	0,1 %	SDS in 1x SSC
Waschpuffer II	0,1%	SDS in 0,5x SSC
Waschpuffer III	0,1%	SDS in 0,2x SSC
RNA-Ladepuffer (10x)	0,4% (w/v)	Bromphenolblau
	0,4% (w/v)	Xylencyanol
	1 mM	EDTA
	50%	Glycerin
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml	in H ₂ O

Zusammensetzung der Lösungen für Western Blot Analysen

RIPA-Puffer	50 mM	Tris/Hcl; pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1%	NP-40
	0,25%	Na-deoxycholate
	1 mM	EDTA
	0,1%	SDS (frisch zufügen)
	1	Cocktailtablette (EDTA free Complete Proteinase Inhibitoren) (frisch zufügen)
Lower-Tris	1,5 M	Tris; pH 8,8
	0,4%	SDS
Upper Tris	0,5 M	Tris ; pH 6,8
	0,4%	SDS
Ammoniumpersulfat	10%	APS in Aqua bidest (w/v)
10x SDS-Puffer	25 mM	Tris / HCl; pH 8,8
	95 mM	Glycin
	0,1%	SDS (w/v)
10x Blotting-Puffer	50 mM	Tris; pH 8,2 - 8,8

	50 mM	Borsäure
10x TBS-Puffer	20 mM	Tris
	137 mM	NaCl pH 7,6
TBST-Puffer	1x	TBS
	0,15%	Tween20
Stripping-Puffer	62,5 mM	Tris / HCl; pH 6,7
	100 mM	β -Mercapthoethanol
	2%	SDS

Zusammensetzung der Lösungen für die Immunhistochemie

PBS/BSA-Puffer	0,5%	BSA (Fraktion V) in 1x PBS gelöst; pH 7,5
----------------	------	--

Zusammensetzung der Lösungen für die Zellkultur

Moscona Lösung	140 mM	NaCl
	9 mM	D-Glucose-Monohydrat
	4 mM	KCl
	12 mM	NaHCO ₃
	0,4 mM	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O
	0,2 mM	KH ₂ PO ₄

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA

3.4.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Für die Untersuchungen der Cx43 Expression nach Bestrahlung mit 5 Gy X-Rays wurde aus zuvor bestrahlten Zellen Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurde der RNeasy Mini Kit verwendet. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung mit 5 Gy zweimal mit Moscona gewaschen. Anschließend wurde die entsprechende Menge RLT-Lysispuffer und β -Mercaptoethanol hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und zum Lysieren mehrfach durch eine Kanüle (Terumo 23G x 1; 0,6 x 25 mm, NEOLUS) aufgezogen. Die RNA Isolierung erfolgte dann gemäß des Protokolls des Herstellers.

3.4.1.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte mit Hilfe des Spektralphotometers Gene Quant II der Firma Pharmacia (Freiburg). Dazu wurde die zu messenden RNA in einer Quarzküvette 1:100 verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 entsprach 40 µg/ml RNA.

3.4.1.3 Auftrennung von RNA in Formaldehyd-Agarose-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1,68%igen Formaldehyd-Agarose-Gelen. Diese Elektrophoresetechnik beruht darauf, dass durch denaturierende Bedingungen die Bildung von RNA-Sekundärstrukturen verhindert wird. Das Laufverhalten der RNA wird durch die Molekülgröße bestimmt. Die verwendeten Formaldehyd-Agarose-Gele enthielten 2,2 M Formaldehyd in 1x MOPS-Laufpuffer. Die RNA wurde in 3 µl Aqua bidest aufgenommen und mit 12 µl RNA-Probenpuffer versetzt, der 1/10 Volumen 10x MOPS-Puffer, 1,6 M Formaldehyd und 50% deionisiertes Formamid enthielt. Zum Denaturieren wurde die RNA für 15 min bei 60°C erhitzt. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 100 V in 1x MOPS-Puffer nach Zugabe von RNA-Ladepuffer zu den Proben. Da dem RNA-Probenpuffer Ethidiumbromid zugesetzt wurde, konnte unter dem UV-Licht die Auftrennung der RNA in die 28S rRNA- und 18S rRNA-Bande beobachtet und die Qualität der RNA überprüft werden.

3.4.1.4 Northern Blot Analyse

Mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurden spezifische mRNA Transkripte durch Hybridisierung von membrangebundener Gesamt-RNA nachgewiesen. Dazu wurde die RNA auf eine Hybond-N-Nylonmembran (Amersham) durch Kapillarkräfte unter Verwendung von 20x SSC transferiert. Der Blotaufbau entsprach der Beschreibung von Sambrook et al. (1989). Der Transfer der RNA dauerte ca. 10-16 h. Anschließend erfolgte die Fixierung der RNA für 2 h bei 80°C. Zur Hybridisierung der Nylonmembran mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden wurde die Membran mit der RNA-Seite nach innen in eine Glasröhre gelegt. Um spezifische DNA-Bindungen zu vermeiden, wurden 10 ml RNA-Hybridisierungslösung und 100 µl Heringssperma-DNA in die Röhre gegeben und für 2-24 h bei 42°C im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Die DNA-Sonde wurde mit der *random primed labelling*-Methode radioaktiv markiert (Feinberg und Vogelstein, 1983). Dazu wurde der Multiprime DNA Labelling Kit (Amersham) verwendet. Es wurden 25 ng DNA mit 10 µl Nukleotidpuffer, 5 µl Primer, 2 µl

Klenow-DNA-Polymerase und 2 µl α -³²P-dCTP mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 31 µl versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Vorher wurde die DNA bei 100°C für 5 min denaturiert. Nicht gebundene Nukleotide wurden durch die Zugabe von 150 µl TE-Puffer über eine Säule abgetrennt. Durch eine 10 minütige Zentrifugation konnte die radioaktiv markierte cDNA-Sonde über die Säule aufgereinigt werden. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die Probe für 5 min aufgekocht, kurz abgekühlt und in die Hybridisierungslösung überführt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Nylonmembran 1 h in Waschpuffer I und je 30 min in Waschpuffer II und III. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und zur Exposition in eine Röntgenkassette gelegt. Durch Auflage eines Röntgenfilms (Kodak XAR-5) für 1-7 Tage bei -80°C erfolgte die Autoradiographie. Für eine erneute Hybridisierung der Membran wurde diese 1 h bei 80°C in autoklaviertem H₂O abgekocht, um die alte Sonde von der Membran zu entfernen. Es erfolgte zur semiquantitativen Auswertung die Rehybridisierung aller Membranen mit einer GAPDH-Sonde auf die gleiche Weise.

Verwendete cDNA-Sonden

Cx43	Plasmid Cx43m-3c, Klonierungsvektor mit Maus-Cx43-cDNA-Fragment (1,3 kb), kann nach EcoRI-Restriktionsverdau isoliert werden (Beyer et al., 1987)
Cx40	Vektor SP64T mit einem 600 bp großen cDNA-Fragment des Ratten-Cx40, kann nach BglII/XhoI Restriktionsverdau isoliert werden (Haefliger et al., 1992)
GAPDH	Plasmid pGAPDH mit einem 1,2 kb großem cDNA-Fragment des humanen GAPDH, kann nach PstI-Restriktionsverdau isoliert werden

3.4.2 Proteine

3.4.2.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellen

Zur Isolierung von Proteinen wurden konfluente Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy X-rays zweimal mit Moscona gewaschen und mit 700 µl RIPA Puffer pro Petrischale (10 cm Durchmesser) lysiert. Somit konnten die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und durch mehrfaches Aufziehen durch eine Kanüle (Terumo 23G x 1 0,6 x 25 mm, NEOLUS) lysiert werden. Nach Überführung des

Zelllysats in Reaktionsgefäße erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Der Proteingehalt der Proben wurde mittels BCA Protein-Bestimmungs-Kit der Firma Pierce (USA) laut den Angaben des Herstellers ermittelt. Die Erstellung der Eichgeraden erfolgte unter Verwendung einer BSA-Verdünnungsreihe.

3.4.2.2 Fällung von Proteinen

Bei zu geringen Proteinkonzentrationen wurden 50 µg der Zelllysate mit 20% TCA im Verhältnis 1:1 gefällt. Nach dem Mischen erfolgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis. Die ausgefallenen Proteine wurden durch Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min (4°C) pelletiert, mit 500 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 20 min, 4°C). In einer SpeedVac (Savant) wurden die Pellets anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl Wasser und 15 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

3.4.2.3 Western-Blot-Analyse

Die Quantifizierung der Protein-Expression erfolgte mit Hilfe der Western Blot Methode. Dazu wurde die denaturierende SDS-PAGE (**S**odium-**D**odecyl-**S**ulfat-**P**olyacrylamid-**G**elelektrophorese) nach Laemmli (1970) durchgeführt (Laemmli et al., 1970). Bei dieser Methode werden Proteine durch ein elektrisches Feld in einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Der Komplex aus primärem Antikörper und Protein kann durch einen sekundären Antikörper, der HRP-gekoppelt (*Horse Radish Peroxidase*) ist, nachgewiesen werden. Dieser sekundäre Antikörper ist gegen das Immunglobulin des primären Antikörpers gerichtet.

Dazu wurden 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Herstellung der Gele erfolgte nach der „Mini Protean Manual Instrucion“ von BioRad. Für die Herstellung der Gele wurde die konzentrierte Acrylamidlösung Rotiphorese® Gel 30 (Roth) verwendet (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid). Bei angelegter Spannung wandern große Proteine langsamer, kleine Proteine schneller durch das Gel. Die zu untersuchenden Proteinlösungen enthielten 30 µl Probenvolumen und 50 µg Protein. Nachdem die Proben mit Probenpuffer (2x Probenpuffer, 3% β-Mercapthoethanol) gemischt wurden, erfolgte eine 5 minütige Denaturierung der Proteine bei 100°C. Neben der Beladung des Gels mit 50 µg Protein pro Tasche, wurde zusätzlich eine Tasche mit einem Größenmarker (Cruz Marker MW

Standards, sc-2035) beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V bis zum Auslaufen der Bromphenolfront (ca. 1,5 h). Der Transfer der Proteine von den Gelen auf eine PVDF-Membran wurde mit dem „Mini Trans-Blot-System“ von BioRad durchgeführt. Dazu wurden 6 Lagen Whatman-Papier und eine PVDF-Membran in der Größe des Trenngels geschnitten. Nachdem zwei Lagen Flies, das Whatman-Papier und die zuvor in Methanol äquilibrierte PVDF-Membran in 1x Blotting Puffer getränkt worden sind, erfolgte der Aufbau der Blotkammer. In der Transferapparatur erfolgte die Zusammenstellung eines Sandwichs aus folgenden Komponenten: auf die Kathoden-Platte der Blotkammer wurden das angefeuchtete Flies, 3 Lagen Whatman-Papier, die PVDF-Membran, dann das Trenngel, 3 Lagen Whatman-Papier und zuletzt das Flies zusammengelegt. Die Apparatur wurde mit der Anoden-Platte geschlossen. Der Transfer erfolgte für zwei Stunden bei RT bei einer Stromstärke von 60 mA.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers erfolgte eine Coomassie-Blau Färbung der Gele nach dem Blotten. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, wurden die PVDF-Membranen je nach Erstantikörper über Nacht bzw. 1 h bei Raumtemperatur in einer 5%igen Lösung aus fettfreier Milch in TBS/0,15% Tween20 inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte am nächsten Tag für 1,5 h oder für 12 h bei 4°C. Nach Abschluss der Inkubation wurde die PVDF-Membran dreimal für ca. 10 min in TBS/0,15% Tween20-Lösung gewaschen und danach mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur versetzt. Der Nachweis der Reaktion erfolgte mit dem Amersham-ECL-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers. Der Nachweis der Bindung wurde mittels einer Geldokumentationsanlage der Firma BioRad (VersaDoc) dokumentiert. Die densitometrische Auswertung der immunreaktiven Proteinbanden wurde mit der Gel-Imager-Software (Intas, Göttingen) durchgeführt und gegen das zugehörige GAPDH-Signal normalisiert.

3.4.2.4 Verwendete Antikörper

Die unten aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper (in TBST+0,5% Milchpulver) wurden zum Nachweis der jeweiligen Proteine verwendet:

Primärantikörper

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Inkubationszeit	Firma
anti-cleaved Caspase-3	Kaninchen	1:1000	ÜN bei 4°C	Cell Signalling, USA
anti-p21	Maus	1:2000	ÜN bei 4°C	Cell Signalling, USA
anti-p53	Kaninchen	1:1000	ÜN bei 4°C	Cell Signalling, USA
anti-GAPDH	Maus	1:1000	1.5 h RT	Chemicon, Hamshire, UK

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Inkubationszeit	Firma
anti-Maus	1:10.000	1 h bei RT	Santa Cruz, USA
anti-Kaninchen	1:2000	1 h bei RT	Santa Cruz, USA

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Herkunft
Jeg3	humane Chorionkarzinomzelllinie
Jeg3 Cx43 Transfektanten	humane Chorionkarzinomzellen, die stabil mit Cx43 transfiziert wurden (Gellhaus et al., 2004)
Jeg3 Cx26 Transfektanten	humane Chorionkarzinomzellen, die stabil mit Cx26 transfiziert wurden (von A. Gellhaus generiert, Institut für Anatomie, Uniklinik Essen)
bEnd3	Maus Endothelzelllinie, PymT-transformiert aus Gehirn-Mikrogefäßen (Montesano et al., 1990) (freundlicherweise von P. Meda, Genf, zur Verfügung gestellt)
EA.hy926	humane Hybrid-Endothelzelllinie, fusioniert aus Nabelschnurzellen und Lungenepithel-Zellen (A549) (freundlicherweise von Dr. Cora-Jean S. Edgell, University of North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt)

Zellkulturmedien

Jeg3	MEM (<i>Minimum essential medium</i>) 10% tetrazyklinfreies FCS 2 mM L-Glutamin
Jeg3 Cx43 Transfektanten	Jeg3 Medium 500 µg/ml G418 0,5 µg/ml Puromycin
Jeg3 Cx26 Transfektanten	Jeg3 Medium 500 µg/ml G418 0,2 µg/ml Puromycin

bEnd3	DMEM (<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>) 10% FCS 100 µg/ml Streptomycin 100 U/ml Penicillin
EA.hy926	DMEM (<i>Dulbeccos modified eagles medium</i>) 10% FCS 4,5 g/l Glucose

3.5.2 Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37°C in einem befeuchteten Brutschrank (Nuaire) unter CO₂-Begasung (5%). Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Als Kultivierungsgefäße wurden Zellkulturflaschen mit einer Grundfläche von 25 cm² (T25) und 75 cm² (T75) der Firma Falcon (Heidelberg) verwendet. Zur Durchführung einiger Experimente wurden auch Petrischalen von 10 cm Durchmesser und 6-Loch-Kulturplatten (Falcon, Heidelberg) eingesetzt. Die Sterilisation der verwendeten Kulturmedien erfolgte durch Filtration. Glasgeräte wurden bei 180°C 8 h hitzesterilisiert, wobei Plastikartikel bei 120°C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert wurden. Je nach Proliferationsrate erfolgte die Versorgung der in Kultur gehaltenen Zellen zwei- bis dreimal wöchentlich mit frischem Medium. Bei Konfluenz der Zellen wurden sie passagiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums, wurde der Zellmonolayer mit Moscona-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Trypsin für eine Minute bei 37°C, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach Resuspension in Kulturmedium wurden die Zellen in unterschiedlicher Verdünnung in neue Zellkulturflaschen überführt.

Zur Induktion der Connexin-Expression in den Jeg3 Cx43 und Cx26 Transfektanten musste das Medium mindestens 48 h vorher mit 1 µg/ml Doxyzyklin (Dox) versetzt werden.

3.5.3 Lagerung eukaryontischer Zellen

Zur Langzeitkonservierung der Zelllinien wurden Aliquots bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu mussten konfluente Zellen nach einminütiger Trypsin-Inkubation 8 min bei 800 Upm in einer Heraeus Laborzentrifuge zentrifugiert und das Zellpellet in 3,2 ml Kulturmedium aufgenommen werden. Je 1,8 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryogefäß (Cellstar, Greiner) überführt und

mit 10% DMSO als Frostschutzmittel versetzt und zügig gemischt. Unmittelbar nach dem Vermischen erfolgte die Lagerung der Kryoröhrchen im Stickstoffdampf oder bei -80°C . Für die längerfristige Lagerung mussten die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens unter leichtem Schwenken bei 37°C zügig in einem Wasserbad aufgetaut. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 800 Upm, um das DMSO zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T25-Zellkulturflasche verteilt. Um abgestorbene Zellen zu entfernen, wurde nach 24 h ein Mediumwechsel vorgenommen.

3.7 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

3.7.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Trennung bereits kokultivierter Zellpopulationen erfolgte mittels FACS-Analyse. FACS ist die Abkürzung für **F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting und ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Das Prinzip der Durchflusszytometrie erlaubt es in kurzer Zeit eine große Zahl einzelner Zellen aus einer Suspension zu untersuchen. Zur Analyse wird die Zellsuspension aus einem Probenröhrchen über eine Stahlkapillare mittels Überdruck durch eine Messkammer gedrückt und beim Eintreten in die Messkammer durch eine Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auftrennen. Dabei werden die Zellen hydrodynamisch fokussiert, indem dem schnell fließenden Transportstrom in einer Düse der langsam fließende Probenstrom zugemischt wird. Die Zellen passieren dann einzeln den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488 nm. Das Laserlicht wird durch die vorbeifließende Zelle gestreut und gelangt dann zu einem Detektorsystem aus Bildverstärkerröhrchen. Das eingehende Signal wird über einzelne Verstärker geregelt und zu einem Analog-Digital-Wandler geleitet. Die digitalisierten Daten werden dann in einem entsprechenden Computer weiterverarbeitet. Dabei wird die Vorwärtsstreuung (FSC) als Maß für die Größe, die Seitwärtsstreuung (SSC) als Maß für die Granularität der Zelle erfasst. Die Homogenität (oder Granularität) einer Zelle wird über das im rechten Winkel gestreute Laserlicht ebenfalls mit einem Photodetektor bestimmt. Über drei

weitere Messkanäle kann gleichzeitig zu den zuvor beschriebenen Parametern Licht verschiedener Wellenlängen aufgezeichnet werden. Darüber hinaus werden zu jedem Datenfile die Einstellungen des FACS-Gerätes, die Parameter zur Aufzeichnung in der verwendeten Software (Cellquest, Becton Dickinson, San Jose, USA) und der Zeitpunkt, an dem jede einzelne Zelle den Messtrahl passiert, aufgezeichnet. Neben der Detektion der Zellgröße und Granularität besteht auch die Möglichkeit, Fluoreszenzfarbstoffe einzusetzen und Zellen spezifisch zu markieren. So können mit diesem Verfahren Strukturen auf der Zelloberfläche, oder nach Permeabilisieren der Zellen, auch im Zellinneren detektiert werden. Ferner lassen sich intrazellulär pH-Bestimmungen und $[Ca^{2+}]_i$ Messungen ermitteln. Eine besondere Bedeutung kommt der Möglichkeit zu, DNA-Strangbrüche durch Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen zu detektieren, da diese als ein frühes Anzeichen für das Auftreten von Apoptose in den untersuchten Zellen herangezogen werden können.

3.7.2 Quantifizierung der interzellulären Kopplung über Gap Junctions mittels Farbstofftransfer mit Hilfe von FACS-Analysen

Zur Untersuchung der interzellulären Kopplung durch Gap Junction Kanäle wurde die FACS-Analyse verwendet. Mit Hilfe einer oder mehrerer Fluoreszenzmarkierungen können bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene erfasst werden. Dabei verhält sich die Anzahl emittierter Photonen (Intensität) proportional zur gebundenen Farbstoffmenge.

Um den Kopplungsgrad mittels Gap Junction Kanäle in Zellen zu analysieren, wurde der *Parachute Assay* angewendet (Czyz et al., 2000). Diese Methode basiert auf dem Transfer von Calcein von Calcein gefärbten Donorzellen zu Akzeptorzellen. Der Farbstoff Calcein-AM ist membranpermeabel, so dass es intrazellulär zu einer Spaltung von Calcein-AM durch unspezifische Esterasen kommt. Es entsteht das polyanionische, grün fluoreszierende Calcein, welches nicht mehr membrangängig ist, sondern nur noch über Gap Junction Kanäle ausgetauscht werden kann.

Zur Durchführung von FACS-Analysen wurden 48 h vor dem Experiment 1×10^6 Zellen pro Petrischale ausplattiert (insgesamt 4 Petrischalen: 3x für Calcein-AM Färbung, 1x Dil Färbung). Um die Donorzellen mit Calcein-AM (Kat. Nr. C-3100, Molecular Probes) zu beladen, wurden die Zellen nach Trypsinierung in Färbemedium resuspendiert. Die Färbung von 1×10^6 Zellen in 1 ml Nährmedium

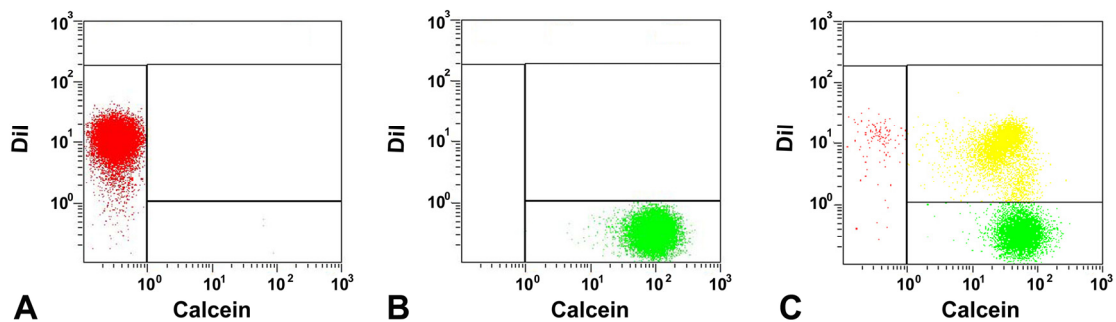


Abb. 5: Darstellung der Kopplungsanalyse mittels Farbstoff Transfer Assays. (A) Punktwolkendiagramm zur Darstellung der Dil Färbung. **(B)** Calcein Färbung der Donor-Zellpopulation in der unteren rechten Ecke. **(C)** Durch die Zellkopplung zwischen Dil und Calcein gefärbten Zellen erfolgt ein shift der Akzeptorzellpopulation in Richtung des Calcein Kanals.

erfolgte mit 1 μ l Calcein-AM aus einer Calcein-Stocklösung (50 μ g Calcein-AM in 50 μ l DMSO). Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Stoppen der Färbung der Zellen erfolgte durch zweimaliges Waschen und Zentrifugieren mit Moscona. Die Akzeptorzellen wurden mit dem membranständigen, rot fluoreszierenden Farbstoff Dil (Kat. Nr. V-22885, Molecular Probes) zur besseren Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen beladen. Die Färbung der Akzeptorzellen erfolgte direkt in Petrischalen mit adhären Zellen. Dazu wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C in einer Dil-Färbelösung (20 μ l Dil Stocklösung pro 1×10^6 Zellen in 4 ml Nährmedium, Endkonzentration entspricht 5 μ M) inkubiert. Nach der Dil-Färbung wurden die Zellen zweimal mit Moscona gewaschen, um überschüssiges Färbemedium auszuwaschen. Für die Kopplung der Akzeptorzellen mit den Donorzellen wurden die mit Calcein-AM gefärbten Zellen im Verhältnis 2:1 zu den mit Dil gefärbten adhären Zellen gegeben. Zur Kontrolle der Färbung musste je eine Petrischale mit Dil bzw. Calcein-AM gefärbt werden. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen trypsinisiert, in Kulturmedium resuspendiert und mit einem FACS-Gerät (FACScan flow cytometer, Beckman Coulter, Krefeld) der Farbstoff-Transfer der Donor- zu Akzeptorzellen ermittelt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente pro Versuchsansatz durchgeführt. Die Aufnahme der Fluoreszenzintensität erfolgte mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm. Pro Probe wurden 10.000 Zellen gemessen. Die Versuchsansätze konnten hinsichtlich der Akzeptorzell-Population durch ein elektronisches Auswählen dieser Zellpopulation (*gating*) analysiert werden. Sie war im *dot plot* in

der oberen linken Ecke lokalisiert und wies eine starke rote Fluoreszenz im Dil-Kanal (FL-2) auf (Abb. 5A). Die Donor-Zellpopulation in der unteren rechten Ecke war durch eine hohe grüne Fluoreszenz im Calcein-Kanal (FL-1) gekennzeichnet (Abb. 5B). Eine Zellkopplung zwischen beiden Populationen, war am Shift der Akzeptorzell-Population in Richtung Grün-Fluoreszenz (FL-1) zu erkennen (Abb. 5C). Die Prozentzahl der Calcein positiven, kommunizierenden Akzeptorzellen wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{gekoppelte Zellen in \%} = \frac{\text{Anzahl der gelb gefärbten Zellen (sowohl Calcein als auch Dil gefärbte Zellen)} \times 100}{\text{Anzahl der gelb gefärbten Zellen} + \text{Anzahl Dil positiver Zellen}}$$

3.7.3 Kokultorexperimente zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten

Die Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten erfolgte über Kokultorexperimente mit bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Das Kokultursystem erlaubt durch die Kokultivierung von unbestrahlten und bestrahlten Zellen die Analyse der Interaktion beider Populationen.

Dazu wurden unbestrahlte und ungefärbte Zellen mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und Dil gefärbten Zellen für 4h kokultiviert. Für die Kokultivierung mussten die adhärent gefärbten Dil Zellen trypsinisiert und anschließend auf die ungefärbten Zellen gegeben werden. Nach der Kokultivierungszeit wurden die Zellen mit Hilfe des fluoreszenzaktivierten Zellsortierers wieder nach bestrahlten und unbestrahlten Zellen getrennt (Abb. 6). Die Zellsortierung erfolgte mit dem System FACSVantage® der Firma Beckton-Dickinson. Hierzu wurden mit Hilfe der Software für den CellSorter die gewünschten *gates* für die zu trennenden Zellpopulationen festgelegt. Die vierstündige Kultivierungszeit war für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten notwendig. Während einer Messung wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie 330.000 Zellen sortiert. Bis zur Sortierung der Zellen erfolgte die Lagerung bei 4°C. Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Populationen nach der Zellsortierung, wurden die bereits getrennten Zellen nochmal mit der FACS-Analyse untersucht, indem 10.000 Zellen aus den bereits getrennten Zellpopulationen sortiert wurden. Dabei wurde überprüft, ob eine Vermischung der bestrahlten und unbestrahlten Populationen erfolgte. Zu den unbestrahlten Kontrollen wurden zusätzliche Kontrollen angesetzt.

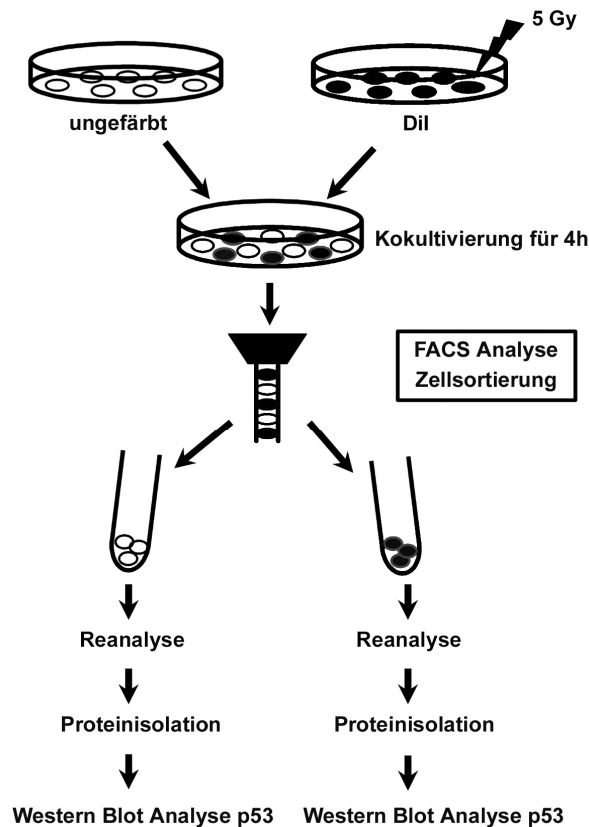


Abb.6: Versuchsablauf der Langzeit Kokulturrexperimente mit bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Ungefärbte, unbestrahlte Zellen wurden für vier Stunden mit Dil gefärbten und mit 5 Gy bestrahlten Zellen kokultiviert. Nach der Kokultivierung erfolgte die FACS-Analyse mittels Zellsortierung. Nach anschließender Reanalyse der bereits getrennten Zellpopulationen wurde das Gesamtprotein aus den jeweiligen Populationen isoliert und im Western Blot auf die Aktivierung der p53 Expression untersucht.

Diese Kontrollen wurden genauso wie die kokultivierten Populationen behandelt und mit dem FACS-Gerät je 200.000 Zellen sortiert. Auch aus diesen Kontrollzellen wurde das Gesamtprotein isoliert. Die Analyse der p53 Aktivierung erfolgte für je 100.000 Zellen mittels Western Blot Analyse. Zur Überprüfung des Zellzustandes während der Versuchsdurchführung wurde eine Population im ganzen Versuchsablauf im Brutschrank inkubiert. Ob p53 durch die Dil Färbung aktiviert wurde, wurde mittels einer Zellpopulation untersucht, die unter den gleichen Färbebedingungen gefärbt und inkubiert wurde wie für die Kokulturrexperimente. Eine andere Zellpopulation wurde, ohne dass diese bestrahlt wurde, zur Bestrahlungsanlage mitgeführt, um auszuschließen, dass durch den Transport p53 aktiviert wird. Eine weitere Kontrolle stellten Dil gefärbte und mit 5 Gy bestrahlte Zellen dar. Diese Zellen wurden ebenfalls trypsiniert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C gelagert. Die Kokulturrexperimente wurden für parentale Jeg3 Zellen dreimal und für Jeg3 Cx43

und Cx26 Transfektanten viermal durchgeführt. Von diesen Zellen wurden 150.000 sortiert und im Western Blot untersucht.

3.8 Immunhistochemie

3.8.1 Antikörper

Primäre Antikörper

Anti-Cx43	polyklonales affinitätsgereinigtes Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Cx43, Verdünnung 1:200 (Traub et al., 1994, freundlicherweise von O. Traub, Bonn, zur Verfügung gestellt)
Anti-Cx26	polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen den C-Terminus von Cx26, Verdünnung 1:200 (Zymed, USA)
p53	polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das phosphorylierte p53, Verdünnung 1:1000 (Cell Signalling, USA)

Sekundäre Antikörper

AlexaFluor-488-konjugierte anti-Kaninchen-IgG	polyklonales Antiserum aus Ziege, 1:100 (MoBiTech, Göttingen)
Cy3-Anti-Kaninchen	Cy3 markiert, polyklonales Antiserum aus Ziege, 1:300, (Dianova, Hamburg)

3.8.2 Indirekte Immunzytochemie mit Fluoreszenzmarkierung

Zur Durchführung der Fluoreszenzmarkierung wurden Zellen auf Deckgläschen (Cover-Slips, Ø 15mm) ausplattiert und bis zur Semikonfluenz kultiviert. Vor der Fixierung erfolgte die zweimalige Waschung der Zellen mit Moscona. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit Methanol/Aceton (1:1) bei RT fixiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift der fixierten Zellen für 5 min mit PBS. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die fixierten Zellen

für 10 min mit 0,5% PBS/BSA-Lösung inkubiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 1,5 h bei RT oder ÜN bei 4°C in einer feuchten Kammer. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA-Lösung wurden die Zellen 45 min bei RT unter Lichtausschluss mit dem zweiten Antikörper Alexa Fluor-488 Antikörper oder Cy3-gekoppeltem sekundären Antikörper inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen mit PBS/BSA unter Lichtausschluss wurden die Präparate kurz mit Aqua bidest gespült, mit Mowiol eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte an einem Axiophot mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Zeiss) oder an einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (LSM 510, Zeiss).

3.9 Bestrahlung

3.9.1 Bestrahlung mit Röntgenstrahlen

Die Bestrahlung von konfluenten Zellen erfolgte bei Raumtemperatur mit einem Pantak X-ray Gerät (Pantak, East Haven, Connecticut, USA) am Institut für Strahlenbiologie, Universität Duisburg-Essen (Prof. Iliakis). Dabei betrug die Röntgenspannung 310 kV und 10 mA, mit einem 2 mm Al Filter. Der Fokusabstand betrug 75 cm bei einer Dosisleistung von 2,7 Gy/min. Unmittelbar nach Bestrahlung wurden die Zellen in den Inkubator zurückgestellt.

3.9.2 Die Ionenbeschleunigeranlage der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB)

Im Rahmen einer Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB) wurden strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Bestrahlung mit α -Teilchen einzelner, lebender Zellen in einer Zellpopulation mit Hilfe eines fokussierten Mikroionenstrahls untersucht. Mit dem Mikroionenstrahl können Zellen mit einzelnen oder einer definierten Anzahl hochenergetischer α -Teilchen gezielt bestrahlt werden, so dass die Wirkung von Strahlung auf die Zellen besser untersucht werden kann. Der Mikroionenstrahl ermöglicht eine Zielgenauigkeit von 2 μm , so dass die selektive Bestrahlung verschiedener Zellbestandteile wie Zellkern bzw. Zytoplasma bestrahlt werden können. Dies ist mit herkömmlichen Bestrahlungstechniken nicht möglich (Greif, 2002).

3.10 Aufbau der Ionenbeschleunigeranlage der PTB

Die Mikrostrahlanlage der PTB ermöglicht die Durchführung von Einzelzell Bestrahlungsexperimenten. Weltweit gibt es nur eine geringe Anzahl von

Mikrostrahlanlagen, die für radiobiologischen Experimente geeignet sind. Die PTB Mikroionenstrahl Anlage unterscheidet sich von den meisten anderen Anlagen darin, dass die Bestrahlung in einem weiten Energiebereich möglich ist. Weitere Vorteile sind die verbesserte Orts- und Energieauflösung durch die Strahlfokussierung und der hohe experimentelle Durchsatz von bis zu 50.000 Zellen je Stunde (Greif et al., 2004). Das Stahlrohr des Mikroionenstrahls hat einen horizontalen und einen vertikalen Teil von jeweils ca. 5 m Länge.

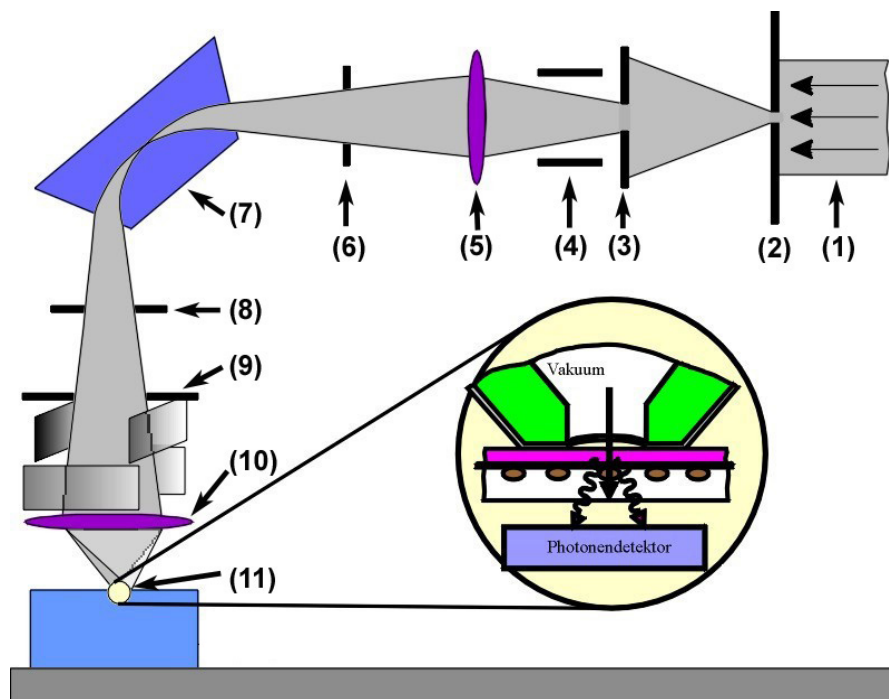


Abb. 7: Aufbau des Mikroionenstrahls. Der einkommende Strahl wird durch ein Zusammenspiel von magnetischen Linsen mit Aperturen und Blenden eingengt. Der Ionenstrahl tritt durch ein Vakuumfenster aus dem Vakuum aus, so dass die Zellen bestrahlt werden können (näheres siehe Text) (Greif, K.: Mikro-Ionenstrahl-Apparatur zur Exposition lebender Zellen, Dissertation, 2002).

In der Mitte befindet sich ein Dipolmagnet, der den Strahl nach unten ablenkt, so dass sich der Experimentierplatz im Kellergeschoss der Experimentierhalle befindet und die Bestrahlung der Zellen immer vertikal von oben erfolgt. Die räumliche Einengung des Ionenstrahls wird durch ein Zusammenspiel von magnetischen Linsen mit Aperturen und Blenden erreicht (Abb. 7). Der einkommende Ionenstrahl (1) wird durch die Objektblende (2) auf wenige Mikrometer eingeschränkt. Der Divergenzschlitz (3) engt den Winkelbereich des Ionenstrahls ein und ermöglicht die Reduktion des Strahlstroms. Der elektrostatische Deflektor (4) erlaubt es, den Strahl schnell ein- und auszuschalten (*beam shutter*). Das Quadrupolduplett (5) im horizontalen Teil der Strahlführung

fokussiert den Strahl. Der Dipolmagnet (7) lenkt den Strahl mit einem Biegeradius von 75 cm um 90° senkrecht nach unten. Die Energieschlitze (6-8) ermöglichen im Zusammenspiel mit dem Dipolmagneten die energiewahlige Abbildung des Ionenstrahls. Die Anti-Streu-Schlitze (9) eliminieren Streuteilchen, die sich weit entfernt von der Sollbahn befinden, ohne den Sollstrahl zu beeinträchtigen. Alle Schlitze (3, 6, 8, 9) dienen darüber hinaus auch als Messinstrumente für die Strahllage, da der Strom auf jeder Schlitzbacke gemessen wird. Ein Quadrupoldublett (10) mit hohem Feldgradienten fokussiert den Ionenstrahl mit einer Bildweite von weniger als 20 cm. Der Ionenstrahl tritt durch ein Vakuumfenster (11) aus dem Vakuum aus.

3.10.1 Vorbereitung der Zellen für Einzelzellbestrahlungen mit dem Mikroionenstrahl

Zur Bestrahlung einzelner Zellen mit dem Mikroionenstrahl, musste die Position jeder einzelnen Zelle vor der Bestrahlung bestimmt werden. Für die Bestrahlung wurden 10.000 Zellen 24 h vor der Bestrahlung auf speziell konstruierte Bestrahlungsträger ausplattiert. Als Bestrahlungsträger diente ein Ring aus Edelstahl für medizinische Anwendungen, dessen glatte Seite mit einer 12,5 µm starken Biofolie (Vivascience AG, Hannover) bespannt ist (Abb. 8). Zur besseren Anhaftung der Zellen wurden die Bestrahlungsträger vorher mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichtet. Dazu wurde das Poly-L-Lysin 1:10 mit sterilem Aqua bidest verdünnt und für fünf Minuten auf die Folie der Bestrahlungsträger gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde der Bestrahlungsträger 2x mit Moscona gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Zum Ausplattieren der Zellen wurden 10.000 Zellen in 5 µl Nährmedium aufgenommen und in die Mitte der vorher beschichteten Bestrahlungsträgerfolie gegeben. Damit die Zellen, die sich auf die hydrophile Oberfläche der Biofolie angeheftet hatten, nicht austrockneten, wurden die Bestrahlungsträger, in kleine Petrischalen (Ø 5 cm) gesetzt, die wiederum in mit sterilem Wasser befüllte Petrischalen (Ø 10 cm) gelegt wurden. Am nächsten Tag erfolgte die Versorgung der Zellen mit 80 µl frischem Nährmedium. Vor Bestrahlung der Zellen erfolgte die Färbung der Zellkerne für 45 min bei 37°C und 5% CO₂ mit einem HOECHST 33342-Farbstoff (0,254 µM, Sigma).

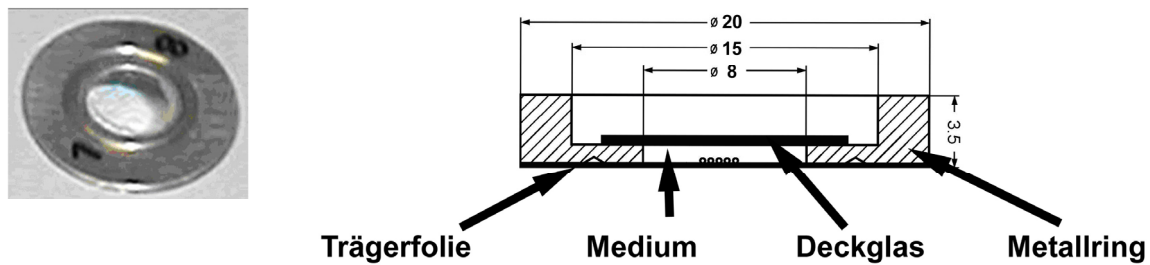


Abb. 8: Bestrahlungsträger zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen. Die Zellen befinden sich auf der Biofolie in der Mitte des Bestrahlungsträgers, so dass sie von Nährmedium bedeckt sind. Um Austrocknung der Zellen zu vermeiden, werden die Zellen durch ein Deckglas geschützt (modifiziert nach Greif, K. 2002).

Durch zweimaliges Waschen der Zellen mit Nährmedium wurden die Zellen entfärbt. Um den Metallring umdrehen zu können, wurde das Nährmedium mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dadurch konnte der Bestrahlungsträger auf dem Mikropositioniertisch befestigt werden, so dass die mit der Biofolie bespannte Seite des Bestrahlungsträgers nach oben zeigte. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axiovert 135 (Carl Zeiss, Jena) konnten die Zellkerne durch Anregung bei 365 nm im blauen Bereich (Emission 420 nm) angeregt und jede einzelne Position der Zellkerne im Kamerabild festgelegt werden. Zur Bestrahlung wurde die gesamte Fläche des Bestrahlungsträgers mit einer CCD (*charge coupled device*) Kamera schrittweise erfasst (eingescannt) und die Position jeder einzelnen Zelle bestimmt. Die Position des Ionenstrahls im Kamerabild wurde entweder zuvor oder nach dem Scannen mit einem Szintillator (BC-400) ebenfalls bestimmt. Für die Repositionierung wurde zusätzlich die Kerbe, die sich als Markierung auf jedem Träger befand, eingescannt und mit den gesamten Bestrahlungspositionen in einer Datei gespeichert. Während der eigentlichen Bestrahlung war die optische Kontrolle nicht möglich, da der Experimentierplatz zur Ionendetektion vollständig abgedunkelt sein musste.

Zum Einscannen wurde ein Mikroskopobjektiv mit großem Arbeitsabstand und Korrektur der Deckglasdicke verwendet (Zeiss LD Achroplan ® 20x Korr). Die Auflichtlampe des Mikroskops war mit einer mechanischen Schließvorrichtung ausgestattet, so dass die Zellen nur während der Belichtungszeit der Kamera (ca. 0,1 s) beleuchtet wurden. Die Anzahl der Zellen, die auf einem Zellträger bestrahlt werden konnten, war von der Geschwindigkeit der Zellerkennung und der Art des Bestrahlungsexperimentes abhängig. In jedem Bestrahlungsgang wurde je ein Bestrahlungsträger zu 100% bestrahlt und ein Bestrahlungsträger nicht und

schließlich mindestens ein Bestrahlungsträger zu 25% bestrahlt. 30 min nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert und eine immunzytochemische Färbung (siehe Kapitel 3.8.2) mit spezifischen Antikörpern gegen p53 durchgeführt.

3.11 Quantitative Auswertung der p53 Protein Expression nach Bestrahlung mit dem Mikroionenstrahl

Die p53 Expression wurde digital nach der immunzytochemischen Färbung ausgewertet. Dazu wurde jeder Bestrahlungsträger zweifach eingescannt: bei dem ersten Scan wurde die Hoechstfärbung und bei dem zweiten die immunzytochemische Färbung mit p53 und dem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper mit der CCD-Kamera aufgenommen. Die Zellen wurden mit Hilfe der Hoechstfärbung automatisch erkannt. Anschließend konnte aus den Zellkernen eine Bildmaske erstellt werden. Darauf wurden die Helligkeitsparameter (integrierte und mittlere Helligkeit, sowie Standardabweichung der Helligkeitswerte) für jede erkannte Zellkernfläche in der p53 Färbung bestimmt. Diese Daten wurden den gemessenen Parametern aus der Zellerkennung für jede Zelle einzeln ermittelt. Um mögliche Fehler in der Auswertung zu vermeiden, wurde zuvor für die p53 Färbung eine so genannte *Shading*-Korrektur durchgeführt, um die ungleichmäßige Bildfeldausleuchtung zu kompensieren. Dazu wurde die Hintergrundhelligkeit für jeden Bestrahlungsträger subtrahiert. Außerdem wurde für jeden Träger die mittlere Helligkeit des Bildhintergrundes bestimmt. Diese musste von der p53 Helligkeit subtrahiert werden, um die Nettohelligkeit zu erhalten und Schwankungen im Helligkeitsniveau zwischen verschiedenen Trägern auszugleichen. Mögliche Ursachen für eine Schwankung der p53-Messwerte zwischen verschiedenen Trägern waren folgende Parameter: Farbstoffreste im Medium, Konzentrationsschwankungen, unterschiedliche Trübung des Mediums oder des Deckgläschens, Verschmutzungen oder abgelöste Zellen im Medium, Schwankung der Intensität der UV Beleuchtung oder Restlicht. Je nachdem, welcher Faktor dominierte, konnte eine Hintergrundsubtraktion oder eine Normierung, d. h. Subtraktion mit anschließender Division der Hintergrundhelligkeit, die geeignete Methode sein. Durch eine Korrelationsanalyse zwischen Hintergrundwert eines Bestrahlungsträgers und p53-Helligkeit wurde die geeignete Methode bestimmt. Für den Vergleich verschiedener Bestrahlungsträger wurde jeweils nur der

Mittelwert der Zellen bzw. der Teilpopulationen (bestrahlter und unbestrahlter Anteil eines Bestrahlungsträgers) verwendet.

3.12 Statistische Auswertungen

Die Signifikanz ($p \leq 0,05$) der Expressionsunterschiede von Transkripten und Proteinen sowie der Intensität der p53 Immunzytochemie aus den Mikroionenstrahlversuchen wurden mit dem gepaarten und ungepaarten Student's T-Test mit Hilfe der Software Microsoft Excel 2000 ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von 5 Gy Röntgenstrahlung auf die Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien

Als Mediatoren für strahlungsinduzierte Bystander Effekte werden sowohl lösliche Faktoren als auch freie Radikale diskutiert. Diese können durch passive Diffusion nach ihrer Exkretion in den Interzellularraum bzw. in das Zellkulturmedium oder durch direkten Transport über Gap Junction Kanäle von den direkt bestrahlten zu den unbestrahlten Zellen gelangen.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass Strahlung auch die Expressionsstärke von Cx43 Kanäle selbst beeinflussen und damit der Bystander Effekt moduliert werden kann, wurde in dieser Arbeit zunächst die Cx43 Expression in den verschiedenen Zelllinien nach 5 Gy Röntgenstrahlung analysiert (Azzam et al., 1998; Azzam et al., 2001; Azzam et al., 2003a; Glover et al., 2003; Liu et al., 1997). Dazu wurden folgende Zelllinien verwendet: bEnd3 (Maus-Endothelzellen), EA.hy926 (humane Endothelzellen), Jeg3 Zellen (humane Chorionkarzinomzellen) und Cx43 induzierbare Jeg3 Transfektanten. Die kommunikationsdefizienten Jeg3 Zellen wurden zuvor stabil mit dem Tetrazyklin induzierbaren Tet-On System mit Cx43 transfiziert (Gellhaus et al., 2004). Die Induktion der Connexine erfolgte nach Gabe von 1 µg/ml Doxyzyklin, einem Tetrazyklin-Analogon, in das Kulturmedium. Die Induktion der Connexin Expression wurde 48h nach Behandlung mit Doxyzyklin analysiert. Die Jeg3 Cx43 Transfektanten haben den Vorteil, dass Connexin Kanäle in diesem Zellsystem durch Gabe bzw. Entzug von Doxyzyklin ein- bzw. ausgeschaltet werden können. Das ermöglicht die Untersuchung von Bystander Effekten in Zellen mit und ohne Expression von Cx43 Kanälen. Weiterhin wurde die kommunikationsdefiziente Zelllinie Jeg3 verwendet.

In dieser Arbeit wurden die Maus-Endothelzellen bEnd3 verwendet, da aus der Literatur bekannt ist, dass Endothelzellen sehr sensitiv auf Strahlung reagieren (Gaugler, 2005). Die immortalisierten bEnd3 Zellen stammen aus Maus Gehirnapillarzellen (Kwak et al., 2001).

Zusätzlich zu den Maus-Endothelzellen wurde eine humane Endothelzelllinie (EA.hy926) zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten eingesetzt. Die humane Endothelzelllinie EA.hy926 wurde mittels Hybridisierung von humanen Nabelschnur Endothelzellen mit humanen Lungenkarzinom Epithelzellen A549 hergestellt (Banaz-Yasar et al., 2005).

Um zu überprüfen, ob und welche Connexin Isoformen in den jeweiligen Zelllinien exprimiert werden, wurden neben Northern- und Western Blot Analysen, immunzytochemische Färbungen mit spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen Connexine durchgeführt. Zudem wurde die Funktionalität der Gap Junction Kanäle mit Hilfe des Farbstoff-Transfer Assays mit Calcein und anschließender FACS-Analyse untersucht.

4.1.1 Analyse der Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien

Um den Einfluss von Röntgenstrahlen auf die Connexin Expression zu überprüfen, wurde zunächst untersucht, welche Connexin Isoformen von den verwendeten Zelllinien gebildet werden. Dazu wurden die Zellen auf ihre Connexin mRNA Expression mit Hilfe der Northern Blot Analyse analysiert. Der Nachweis der Connexin-Transkripte erfolgte durch die Hybridisierung mit Connexin-spezifischen cDNA Sonden an Gesamt-RNA der verwendeten Zelllinien. Aus Gewebe wurde die Kontroll-RNA für die entsprechenden Connexine isoliert, in denen die Expression der jeweiligen Connexine bereits beschrieben wurde. Für Cx43 und Cx40 wurde RNA aus Herz isoliert.

Die Lokalisation der jeweiligen Connexin Proteine wurde mittels immunzytochemischer Untersuchung mit Connexin-spezifischen Antikörpern analysiert, da für den Aufbau funktioneller Gap Junction Kanäle neben der Expression auch die Lokalisation der Connexin Proteine eine essentielle Rolle spielen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass bEnd3 Zellen große Mengen an Cx43 und geringe Mengen Cx40 exprimieren (Kwak et al., 2001). Für EA.hy926 Zellen fehlt in der Literatur die Angabe über die Expression von Connexinen. Die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 exprimiert keine Connexin Proteine und erweist sich sowohl mittels Farbstoffinjektion als auch mit Hilfe des sensitiven Ca^{2+} - *Imaging* als kopplungsdefizient. Mittels RT-PCR sind lediglich sehr geringe Mengen von Cx40 mRNA nachzuweisen (Hellmann et al., 1996).

Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse sind in Abbildung 9 zusammengefasst. Die bEnd3 Zellen exprimieren große Mengen an Cx43 mRNA (Abb. 9A) und Cx40 mRNA (Abb. 9B). Die EA.hy926 Zellen zeigten in der Northern Blot Analyse eine

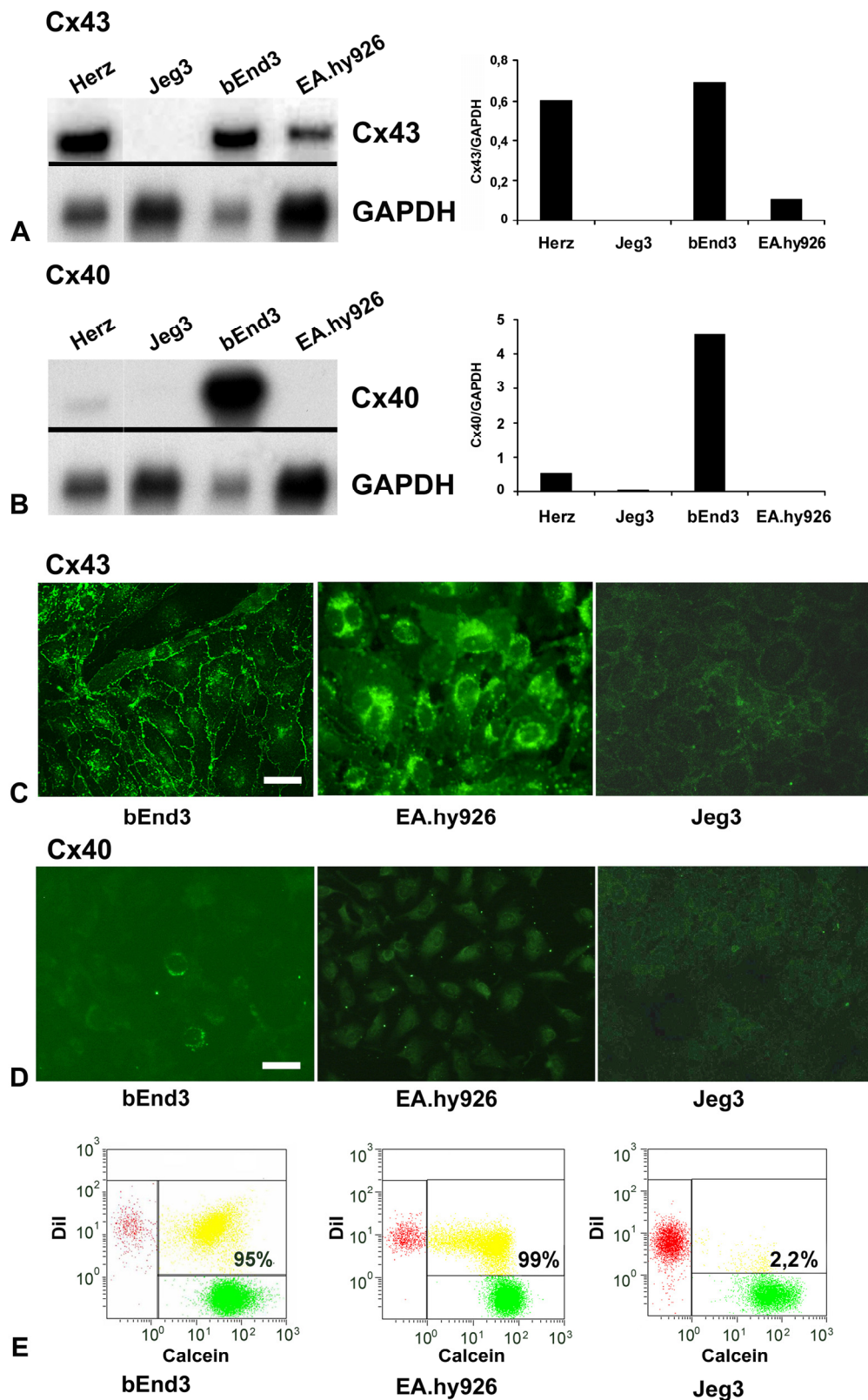


Abb. 9: Charakterisierung der Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien. (A, B) Northern Blot Analyse der Cx43 und Cx40 Expression und Densitometrische Auswertungen zur Bestimmung der relativen Connexin Expressionsstärke durch den Abgleich gegen GAPDH. Zum Vergleich diente Herzgewebe. **(C, D)** Immunzytochemischer Nachweis von Cx43 und Cx40. Cx43 Strukturen sind in bEnd3 und EA.hy926 Zellen an der Zellmembran nachweisbar. Jeg3 Zellen zeigten keine Expression von Cx43 und Cx40. **(E)** FACS-Analyse zur Messung der Kopplungseffizienz. Balken: 40 μ m. * $p \leq 0,05$

starke Cx43 mRNA Expression (Abb. 9A). In dieser Zelllinie konnte mittels Northern Blot Analyse kein Cx40 nachgewiesen werden (Abb. 9B). Jeg3 Zellen zeigten keine Expression von Cx43 und auch keine Cx40 mRNA Expression (Abb. 9A, B).

Um die Cx43 und Cx40 Protein Expression in den jeweiligen Zelllinien zu lokalisieren, wurden immunzytochemische Färbungen mittels spezifischen Antikörpern gegen Cx43 und Cx40 durchgeführt. Die in Abbildung 9C dargestellte immunzytochemische Färbung zeigte, dass bEnd3 und EA.hy926 Zellen eine homogene Cx43 Expression entlang der Zellmembran aufweisen. In Jeg3 Zellen konnte kein Cx43 Protein detektiert werden. Obwohl in bEnd3 Zellen mit Hilfe der Northern Blot Analyse große Mengen an Cx40 mRNA nachgewiesen wurde, konnte auch in den bEnd3 Zellen nur vereinzelt eine schwache Cx40 Protein Expression detektiert werden. In allen anderen untersuchten Zelllinien konnte kein Cx40 Protein nachgewiesen werden (Abb. 9D).

Zur Überprüfung der Funktionalität der Gap Junction Kanäle wurden Farbstoff Transfer Assays mit Calcein und anschließender FACS-Analyse (Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung) quantitativ durchgeführt (Abb. 9E). Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruhte auf dem *Parachute Assay* und wurde zur Etablierung in unserem Labor leicht modifiziert (Czyz et al., 2000; Ziambaras et al., 1998). Dieser Assay ermöglichte es eine große Anzahl an Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die Donorzellen mit dem membranpermeablen Farbstoff Calcein-AM (grüne Fluoreszenz) und die Akzeptorzellen mit dem membranbindenden Farbstoff Dil (rote Fluoreszenz) gefärbt. Nach einer Kultivierungszeit von vier Stunden erfolgte die Messung des Calcein Transfers auf die Akzeptorzellen. bEnd3 Zellen zeigten wie die EA.hy926 Zellen eine starke Kopplungseffizienz. Der Kopplungsgrad für bEnd3 Zellen betrug 95 und für die EA.hy926 Zellen 99%. Wie zu erwarten, wiesen die parentalen Jeg3 Zellen keine Kopplung auf wobei die Kopplungsrate nur 2,2% betrug.

4.1.2 Analyse der Cx43 Expression in bEnd3 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen

Um den Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Cx43 Expression in der Maus-Endothelzelllinie bEnd3 zu analysieren, wurde die Cx43 Expression sowohl auf der Transkriptebene, mittels Northern Blot Analyse, als auch auf Proteinebene mit

Hilfe der Western Blot Analyse und immunzytochemisch nach Bestrahlung untersucht.

Zur Durchführung von Northern Blot Analysen wurde 15 min bis 24 h nach Bestrahlung mit 5 Gy RNA aus Zellen isoliert und 5 µg RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle für Cx43 wurde RNA aus Herzgewebe aufgetragen. Die Northern Blot Analyse der bEnd3 Zellen ist in Abbildung 10A zusammengefasst. bEnd3 Zellen zeigten bereits 15 min nach Bestrahlung mit 5 Gy eine signifikante Erhöhung der Cx43 mRNA Expression im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Es war eine konstante Zunahme des Cx43 Transkriptes zu beobachten, wobei 24 Stunden nach Bestrahlung eine maximale Expression von Cx43 festzustellen war (Abb. 10A). Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, ist in den bestrahlten Zellen nach 24 Stunden die Cx43 Expression um das 3fache erhöht.

Um den Einfluss von Strahlung auf die Cx43 Proteine zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt (Abb. 10B). Dazu wurden die Proteine in einer Zeitreihe zwischen 15 min und 24 Stunden nach Bestrahlung isoliert. 15 Minuten nach Bestrahlung zeigten die bEnd3 Zellen eine signifikante Erhöhung der Cx43 Protein Expression im Vergleich zu den unbestrahlten bEnd3 Zellen. Eine Stunde nach Bestrahlung war die maximale Cx43 Protein Expression erreicht, während 24 h nach Bestrahlung eine geringe Abnahme der Protein Expression zu beobachten war, der jedoch im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen signifikant erhöht war. Im Vergleich zu der Kontrolle war die Cx43 Protein Expression 24 Stunden nach Bestrahlung um das 1,8fache erhöht (Abb. 10B). Die Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen bewirkt eine posttranslationale Modifikation von Cx43. Neben der nicht phosphorylierten Form des Cx43 Proteins, wurde die phosphorylierte Form von Cx43, welche eine Bande bei 45 kDa aufweist, hochreguliert (Abb. 10B). In bEnd3 Zellen korrelierte die Zunahme der Cx43 mRNA Expression mit der Expression von Cx43 auf Proteinebene nach Bestrahlung mit 5Gy Röntgenstrahlung.

Zur Lokalisation des Cx43 Proteins wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt (Abb. 10C). In den unbestrahlten bEnd3 Zellen war eine charakteristische Cx43 Expression entlang der Zellmembran festzustellen. Bereits 15 min nach Bestrahlung war eine Umlagerung des Cx43 Proteins von der

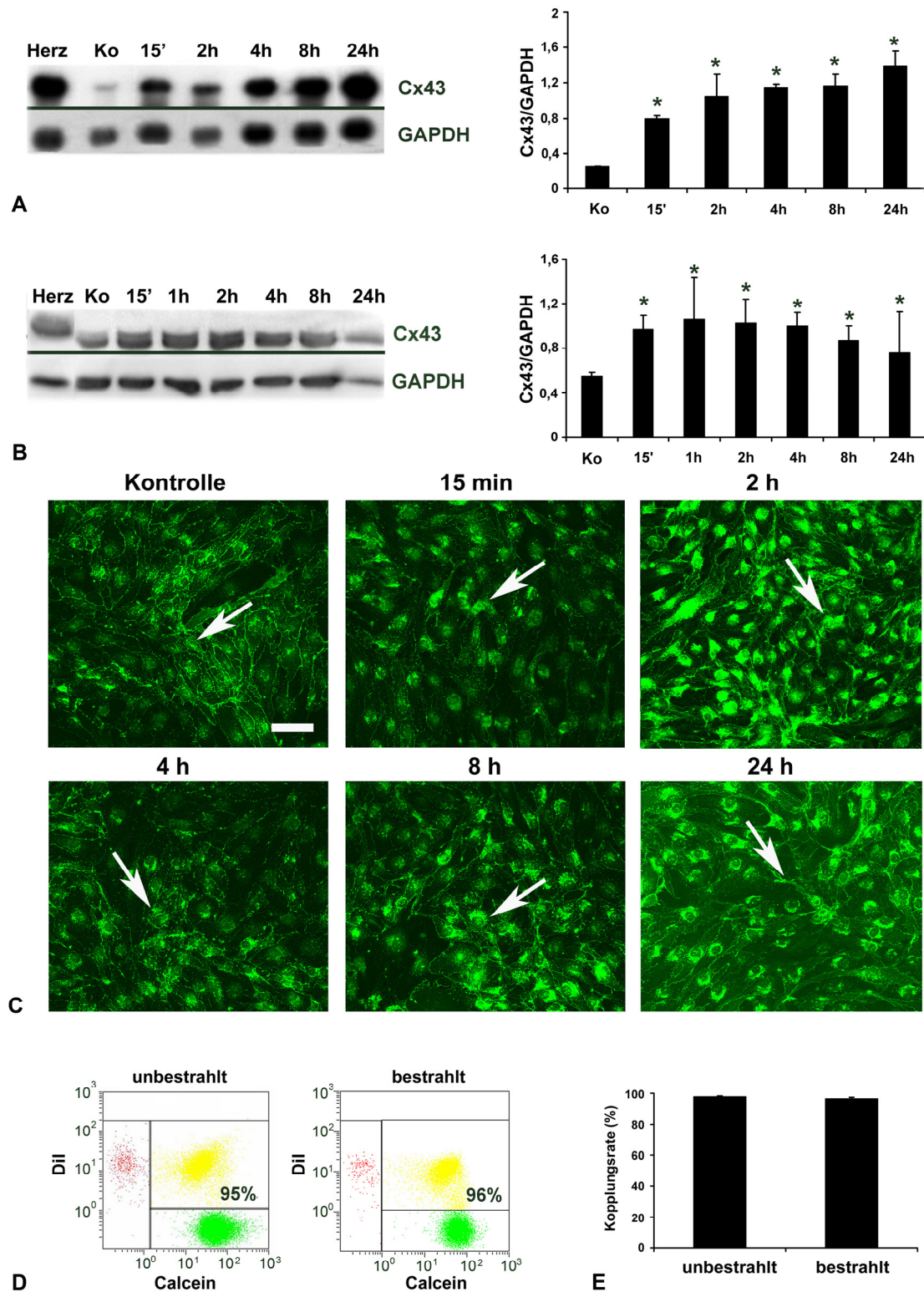


Abb. 10: Hochregulation der Cx43 Expression in bEnd3 Zellen nach Röntgenbestrahlung mit 5 Gy. (A) Northern Blot Analyse der Cx43 mRNA Expression und **(B)** Western Blot Analyse der Cx43 Protein Expression mit densitometrischer Auswertung durch den Abgleich gegen GAPDH (n=3). Bereits 15 min nach Bestrahlung wurde die Cx43 sowohl auf Transkript-, als auch auf Proteinebene signifikant hochreguliert. **(C)** Cx43 Immunzytochemie vor- und nach Bestrahlung. Bis zu 24 h nach Bestrahlung war eine Zunahme des Proteins sowohl entlang der Zellmembran, als auch intrazellulär nachweisbar. **(D, E)** Kopplungsrate von unbestrahlten und bestrahlten Zellen nach FACS-Analyse. bEnd3 Zellen zeigten eine starke Kopplungsrate von 95%, welche durch Bestrahlung nicht verändert wurde (96%) (n=3). Balken: 80 μ m. *p \leq 0,05

Zellmembran in das Zytoplasma der Zellen festzustellen. Zwei Stunden nach Bestrahlung konnte eine Erhöhung der Cx43 Expression im Vergleich zur Kontrolle in bEnd3 Zellen nachgewiesen werden, da das Cx43 Protein sowohl entlang der Zellmembran als auch intrazellulär detektiert werden konnte. Bereits vier Stunden nach Bestrahlung war eine geringe Abnahme des intrazellulären Cx43 Proteins nachzuweisen. 24 Stunden nach Bestrahlung war das Cx43 Protein überwiegend im Zytoplasma detektierbar.

Um den Einfluss der Modifikation der Cx43 Proteins auf die Funktionalität der Cx43 Kanäle nach Bestrahlung zu überprüfen, wurde mittels FACS-Analyse die Kopplung über Cx43 Kanäle für bEnd3 Zellen analysiert. Nachdem Dil gefärbte bEnd3 Zellen mit 5 Gy bestrahlt wurden, erfolgte eine Kultivierung mit den Calcein gefärbten Zellen für vier Stunden. Zur Kontrolle wurden unbestrahlte bEnd3 Zellen auf die gleiche Weise behandelt. Die Kultivierungszeit von vier Stunden wurde zur Bildung von Zell-Zell Membrankontakten benötigt. Nach vier Stunden hatten sich die meisten Gap Junction Kanäle gebildet. Kürzere Kultivierungszeiten (30 min, 1 h, 2 h) zeigten sehr geringe Kopplungsraten. Unbestrahlte bEnd3 Zellen wiesen vier Stunden nach Kokultivierung eine Kopplungsrate von $95\% \pm 0,94$ ($n=3$) (Abb. 10D, E). Nach Bestrahlung mit 5 Gy betrug die Kopplungsrate $96\% \pm 0,47$ ($n=3$), das heißt, dass die Zunahme der Cx43 mRNA und Protein Expression nach Bestrahlung nicht zu einer zusätzlichen signifikanten Erhöhung der funktionellen Kopplung führte.

4.1.3 Analyse der Cx43 Expression in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen

Der Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Cx43 Expression in humanen Endothelzellen ist in Abbildung 11 dargestellt. Im Gegensatz zu den bEnd3 Zellen wurde in den EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy die Cx43 mRNA Expression bereits 1 Stunde nach Bestrahlung signifikant um das 2,4 fache herunterreguliert (Abb. 11A). Diese Abnahme des Cx43 Transkriptes zeigte sich bis zu vier Stunden. Nach acht Stunden wurde der Ausgangswert wieder erreicht, so dass es keine weitere Modulation der Expression des Cx43 Transkriptes bis zu 24 Stunden gab (Abb. 11A).

Auf Proteinebene konnte im Western Blot jedoch keine messbare Abnahme der Cx43 Protein Expression nach Bestrahlung über 24 h festgestellt werden (Abb. 11B).

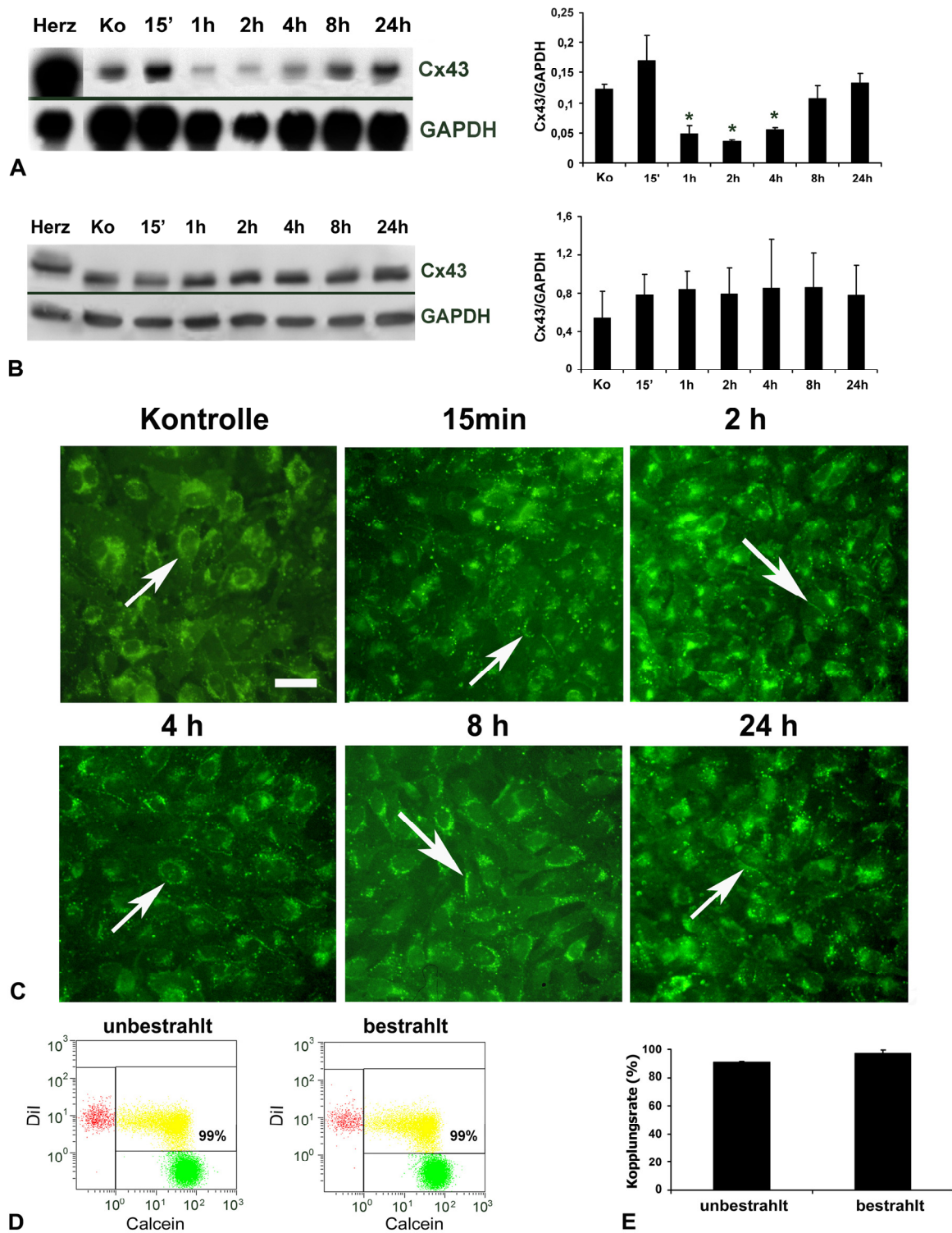


Abb. 11: Modulation der Cx43 Expression in humanen Endothelzellen EA.hy926 nach Bestrahlung mit 5 Gy. (A) Northern Blot Analyse der Cx43 mRNA Expression und **(B)** Western Blot Analyse der Cx43 Protein Expression nach Röntgenbestrahlung. RNA und Protein wurden bis zu 24 h nach Bestrahlung isoliert und analysiert. Die densitometrische Auswertung zeigt drei unabhängige Ergebnisse. Auf Cx43 Transkriptebene war 1 h nach Bestrahlung eine transiente Abnahme der Cx43 Expression festzustellen, wobei auf Proteinebene keine Modulation von Cx43 nachzuweisen war. **(C)** Immunzytochemische Analysen nach Bestrahlung zeigten ebenfalls keine Modulation der Cx43 Proteine im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. **(D, E)** FACS-Analysen in unbestrahlten und bestrahlten Zellen wiesen keine Unterschiede in der Kopplungseffizienz auf. Balken: 40 µm. * $p \leq 0,05$

Die Cx43 Protein Expression wurde auch nach Röntgenbestrahlung mit 5 Gy nicht moduliert, das heißt eine phosphorylierte Form von Cx43 konnte nicht detektiert werden. Immunzytochemisch konnte ebenfalls keine Veränderung der Cx43 Expression nach Bestrahlung festgestellt werden (Abb. 11C). Die nach der Bestrahlung bis zu 24 Stunden kultivierten Zellen zeigten keine Veränderung in der Lokalisation des Cx43 Proteins. Sowohl unbestrahlte als auch bestrahlte Zellen wiesen eine charakteristische punktierte Färbung entlang der Zellmembran vor. Auch im Zytoplasma sowie im perinukleären Bereich, konnte Cx43 Protein nachgewiesen werden.

Um die Funktionalität der Cx43 Kanäle in EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung zu überprüfen, wurde die Kopplungsrate sowohl der unbestrahlten als auch der bestrahlten Zellen mit Hilfe des Farbstoff-Transfer-Assays mit Calcein und anschließender FACS-Analyse bestimmt (Abb. 11D, E). Die Analyse der Zellkopplung der unbestrahlten EA.hy926 Zellen zeigte eine hohe Kommunikationseffizienz von $99\% \pm 0,5$ ($n=3$) nach vierstündiger Kultivierung der Calcein gefärbten Zellen mit Dil gefärbten Zellen. Durch die Bestrahlung wurde die Kopplungseffizienz nicht verändert. Die Zellen zeigten eine Kopplungsrate von $99\% \pm 1,3$ ($n=3$) nach Bestrahlung. Die Abnahme des Cx43 Transkriptes nach Bestrahlung konnte damit auf Proteinebene sowohl mit Hilfe der Western Blot Analyse als auch der Immunzytochemie nicht bestätigt werden. Auch die Kopplungsrate zeigte keine Veränderung nach Bestrahlung.

4.1.4 Analyse der Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Tansfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy

Um den Einfluss von Röntgenstrahlen auf die exogene und auf die endogene Cx43 Expression zu überprüfen, wurden mit Cx43 stabil transfizierte Jeg3 Zellen auf Modulationen in der Cx43 Expression nach Bestrahlung untersucht. Dabei wurde festgestellt, ob durch Bestrahlung das exogene Cx43 moduliert bzw. das endogene Cx43 induziert wird.

Nach Induktion des Cx43 nach Behandlung mit Doxzyklin für 48 h zeigten die Jeg3 Transfektanten eine starke Expression des Cx43 Transkripts im Northern Blot (Abb. 12A), wohingegen uninduzierte Jeg3 Transfektanten das Transkript nicht vorwiesen. Die Immunzytochemie zeigte eine starke Expression von Cx43 entlang der Zellmembran nach Induktion von Cx43 (Abb. 12B). Entsprechend

wiesen uninduzierte Jeg3 Cx43 Transfektanten keine Cx43 Protein Expression auf.

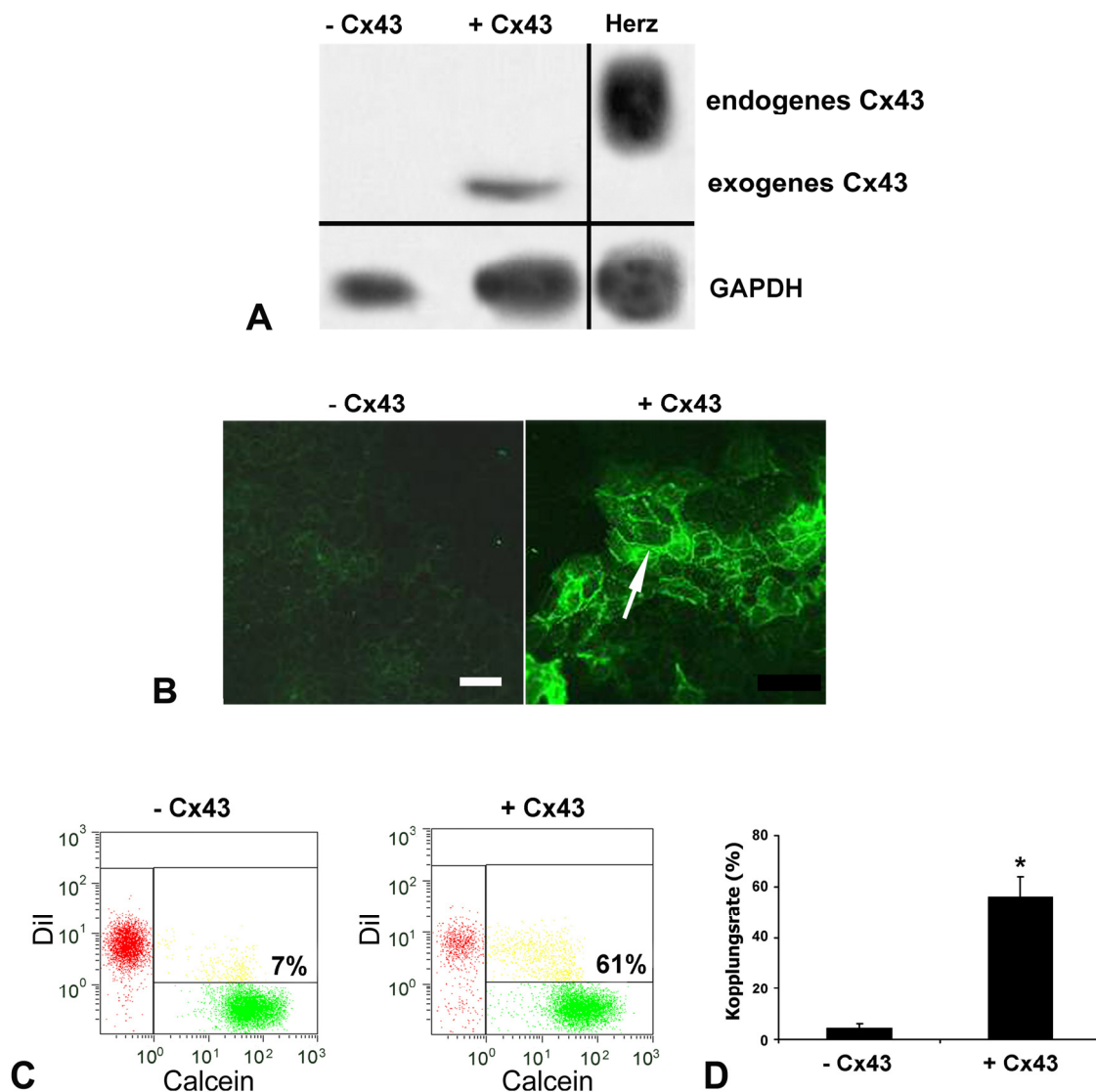


Abb. 12: Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Transfektanten. (A) Northern Blot Analyse. Cx43 transfizierte Jeg3 Zellen zeigten eine starke Expression von Cx43 mRNA nach Behandlung mit Doxyzyklin im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Als Kontrolle für die Cx43 Expression diente Herzgewebe. (B) Immunzytochemischer Nachweis von Cx43 vor und nach Induktion des Cx43 Proteins. Es ist eine durch Doxyzyklin induzierbare Cx43 Protein Expression entlang der lateralen Zellmembran im Vergleich zum uninduzierten Zustand dargestellt (siehe Pfeil). (C, D) FACS-Analysen des Calcein Transfers wiesen eine starke Kopplung in den Cx43 induzierten Jeg3 Zellen im Vergleich zu Cx43 uninduzierten Zellen vor (n=3). Die Kopplungseffizienz nimmt signifikant in Cx43 induzierten im Vergleich zu Cx43 uninduzierten Zellen zu. Balken: 40 μ m. *p \leq 0,05

Die Funktionalität der Cx43 Kanäle in Jeg3 Cx43 Transfektanten wurde mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt (Abb. 12C, D). Die Kopplungseffizienz für die Cx43 induzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten betrug durchschnittlich 61% \pm 7,8 (n=3). Im

Gegensatz dazu zeigten die Cx43 uninduzierten Transfektanten eine geringe bzw. keine Kopplungseffizienz von $7\% \pm 1,7$ ($n=3$).

Um den Einfluss von Röntgenstrahlen auf die Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Transfektanten zu untersuchen, wurden die Transfektanten wie die bereits beschriebenen Zelllinien behandelt. In einer Zeitreihe nach Bestrahlung wurde die RNA und das Protein isoliert und analysiert.

Nach Bestrahlung konnte weder auf Transkript-, noch auf Proteinebene eine Modulation der Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Transfektanten festgestellt werden (Abb. 13A, B, C).

Northern Blot Analysen der Cx43 induzierten Transfektanten zeigten eine konstante Expression des exogenen Cx43 Transkripts nach Bestrahlung mit 5 Gy. Endogenes Cx43 Transkript wurde nicht durch Bestrahlung induziert. Cx43 uninduzierte Jeg3 Transfektanten zeigten keine Expression von Cx43 nach Bestrahlung (Abb. 13A, B). Auf Proteinebene konnte nach Induktion von Cx43 in den Jeg3 Zellen eine konstante Cx43 Proteinexpression nach Bestrahlung im Western Blot ermittelt werden (Abb. 13C).

Um mögliche Veränderungen der Lokalisation des Cx43 Proteins nach Bestrahlung zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt (Abb. 13D). Jeg3 Cx43 induzierte Transfektanten zeigten keine Veränderung der Cx43 Proteins und der Lokalisation 2 h nach Bestrahlung. Sowohl die unbestrahlten Kontrollen als auch die mit 5 Gy bestrahlten Jeg3 Cx43 Transfektanten wiesen eine charakteristische Cx43 Protein Expression entlang der Zellmembran auf.

4.2 Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Expression von p53, p21 und Caspase 3

Um einen geeigneten Marker für den Nachweis von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in mit direkt bestrahlten Zellen kokultivierten unbestrahlten Zellen zu finden, wurde die Expression verschiedener zellulärer Stressmarker wie p53, p21 bzw. der Apoptosemarker Caspase 3 nach Bestrahlung untersucht. Ein geeigneter Marker sollte die Eigenschaft besitzen, relativ schnell nach Bestrahlung aktiviert zu werden.

Dazu wurde die Expression des Tumorsuppressors p53, des Zellzyklusinhibitors p21 und der aktivierten Caspase 3 mittels Western Blot Analyse und Immunzytochemie untersucht.

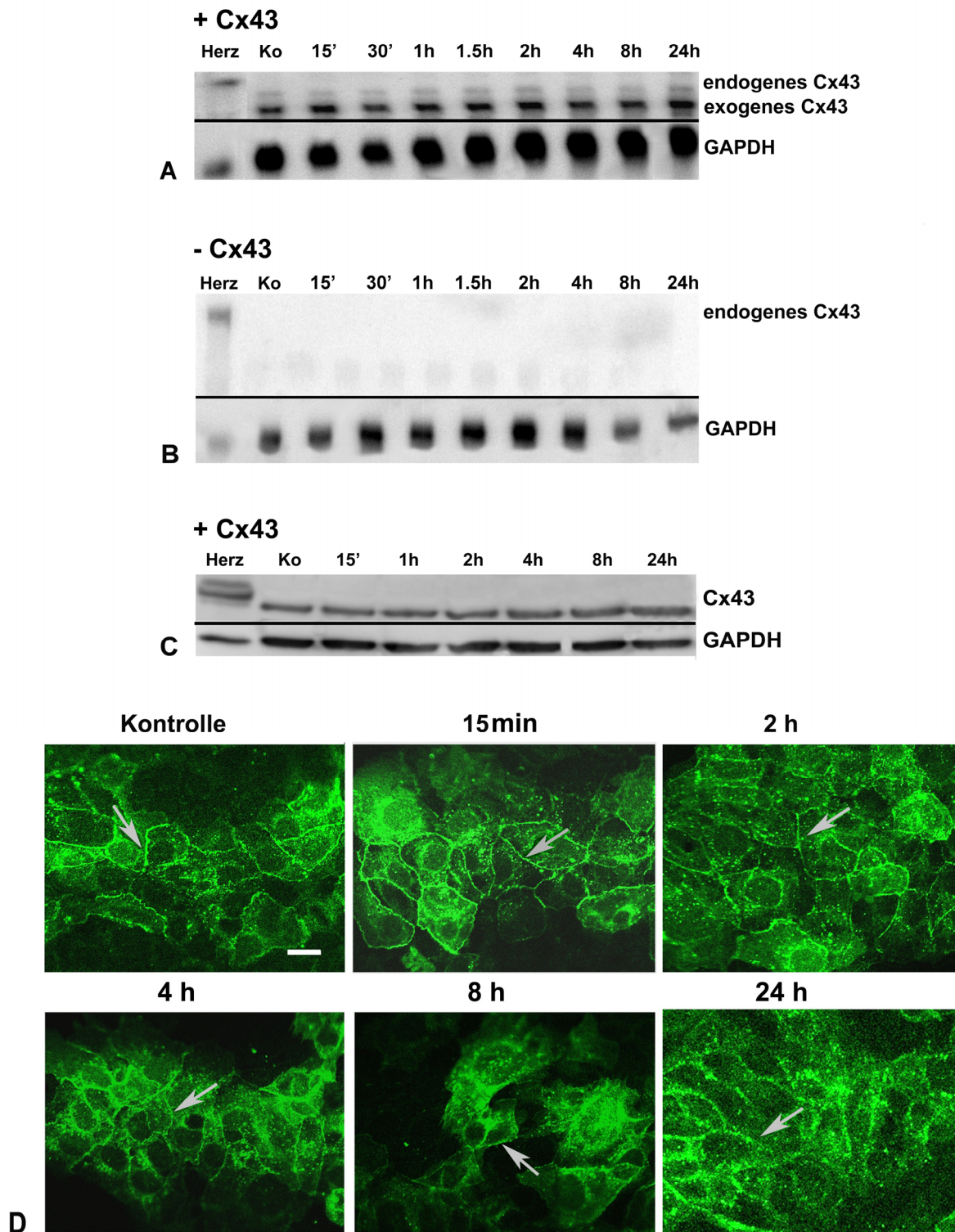


Abb. 13: Cx43 Expression in Jeg3 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy. Northern Blot Analyse von Cx43 induzierten (**A**) und Cx43 uninduzierten (**B**) Jeg3 Cx43 Transfektanten bis zu 24 h nach Bestrahlung. Es konnte keine Modulation des exogenen Cx43 und keine Induktion des Cx43 Transkripts nach Bestrahlung festgestellt werden. (**C**) Auf Proteinebene konnte keine Modulation von Cx43 im Western Blot nachgewiesen werden. (**D**) Immunzytochemische Analysen zeigten bis zu 24 h nach Bestrahlung keine Veränderung der Cx43 Proteinexpression. Ko=unbestrahlte Kontrolle. Balken: 20 µm.

4.2.1 Expression von p53 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung

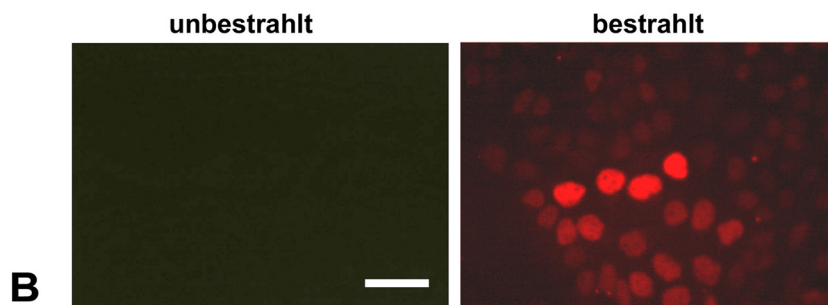
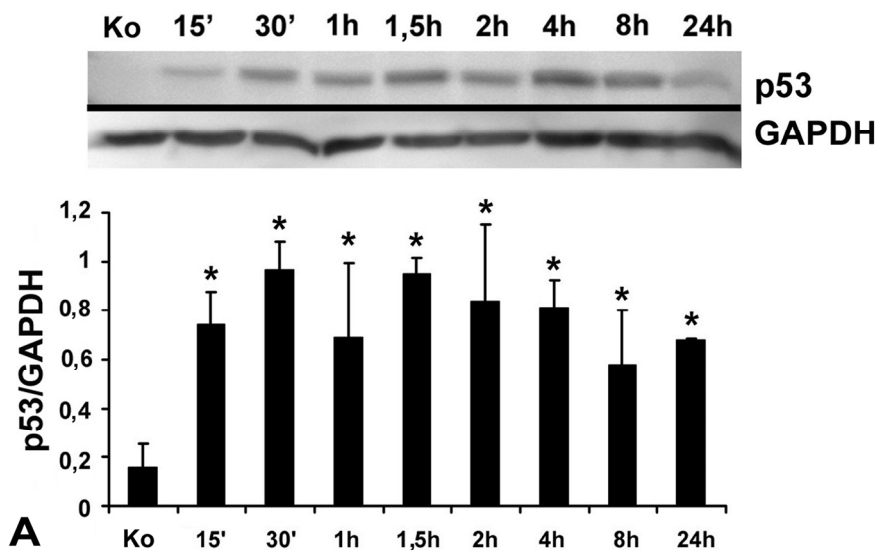
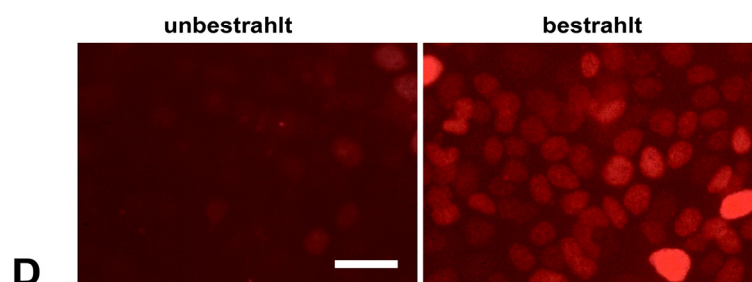
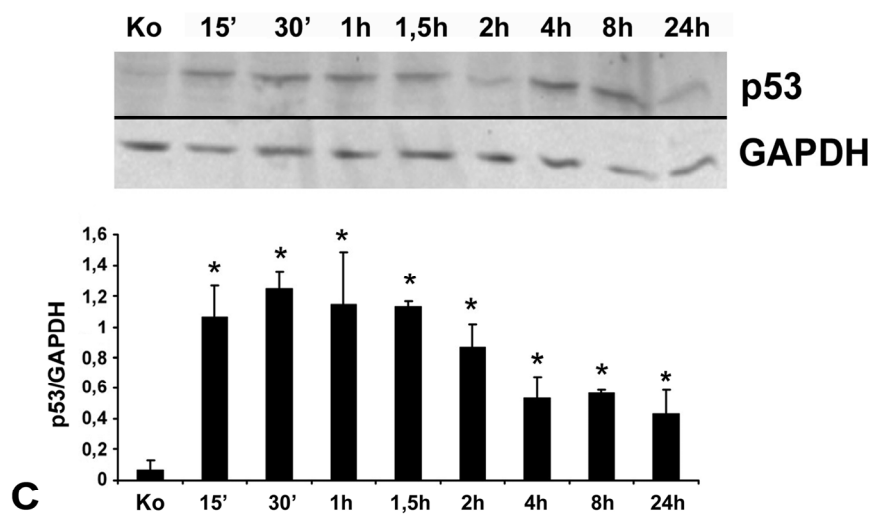
Die Expression des stressinduzierbaren p53 Proteins wurde mittels Western Blot Analyse ermittelt. Zur Lokalisation des Proteins wurden zudem immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Auch zur Untersuchung der p53 Expression nach Bestrahlung wurden die Proteine zu bestimmten Zeitpunkten (15 min bis 24 Stunden) nach Bestrahlung untersucht und mit einem Antikörper gegen p53, der das phosphorylierte Serin 15 und somit die aktivierte Form von p53 detektiert, inkubiert.

Parentale, nicht transfizierte Jeg3 Zellen zeigten bereits 15 min nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung von phosphoryliertem p53, wobei die maximale p53 Expression 30 min nach Bestrahlung erreicht wurde (Abb. 14A). Die hohen p53 Proteinwerte blieben bis zu 24 Stunden relativ stabil, wobei eine geringe Abnahme der p53 Werte festzustellen war.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnte p53 bereits 15 min nach Bestrahlung in den Zellkernen nachgewiesen werden (Abb. 14B). Die unbestrahlten Zellen zeigten keine bzw. nur eine geringe Expression von p53 in den Zellkernen.

Zur Überprüfung der Induktion der Cx43 Proteine in Jeg3 Cx43 Transfektanten wurde die Cx43 Protein Expression im Western Blot analysiert. In den mit Doxzyklin behandelten Jeg3 Cx43 Transfektanten war neben einer starken Cx43 Expression auch p53 nach Bestrahlung nachweisbar (Abb. 14F). In parentalen Jeg3 Zellen und in Cx43 uninduzierten Jeg3 Transfektanten konnte lediglich p53 und kein Cx43 Protein detektiert werden.

Ähnlich wie bei parentalen Jeg3 Zellen, wurde nach Induktion von Cx43 in den Jeg3 Transfektanten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der p53 Expression 15 min nach Bestrahlung festgestellt (Abb. 14E). Uninduzierte Jeg3 Cx43 Transfektanten zeigten den höchsten p53 Wert 30 min nach Bestrahlung. Jedoch wurde die p53 Expression anschließend bis zu 24 Stunden konstant herunterreguliert (Abb. 14C). Die Expression von p53 war allerdings auch 24 Stunden nach Bestrahlung höher als bei den unbestrahlten Kontrollen. Das p53 Protein war in den bestrahlten Cx43 uninduzierten Jeg3 Transfektanten ebenfalls immunzytochemisch bereits 15 min nach Bestrahlung im Zellkern lokalisierbar (Abb. 14D). Im Western Blot wurde bei uninduzierten Jeg3 Transfektanten, wie erwartet, keine Expression von Cx43 nachgewiesen (Abb. 14F).

Jeg3**- Cx43**

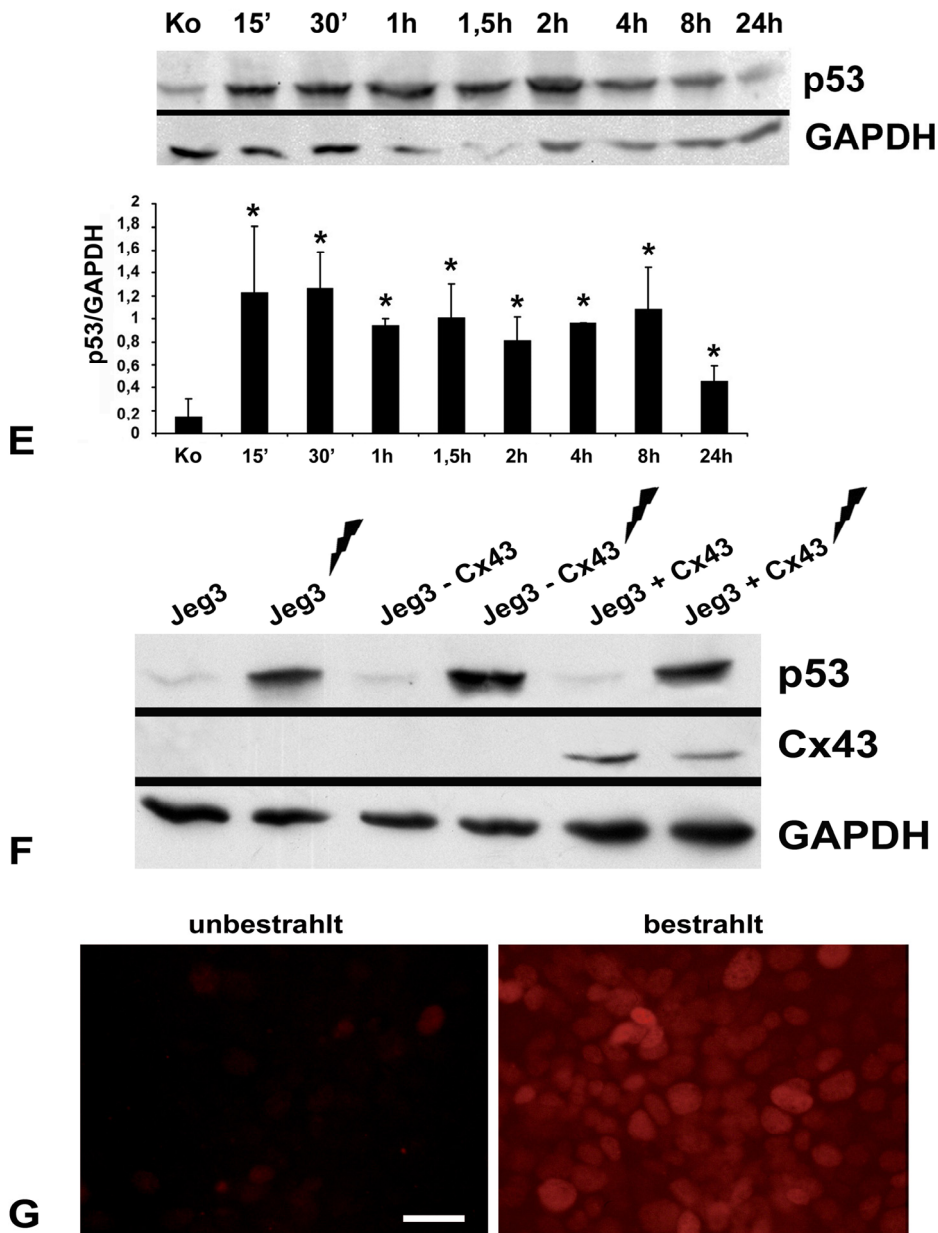
+ Cx43

Abb. 14: p53 Expression in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen. (A, C, E) Western Blot Analyse bis zu 24 h nach Bestrahlung. Bereits 15 min nach Bestrahlung war eine signifikante Erhöhung der phosphorylierten p53 Protein Expression festzustellen, wobei die maximale p53 Expression nach 30 min erreicht wurde. (B, D, G) Mit Hilfe von immunzytochemischen Färbungen konnte das phosphorylierte p53 Protein 15 min nach Bestrahlung in den Zellkernen nachgewiesen werden. (F) Das Cx43 Protein konnte im Western Blot in Cx43 induzierten Jeg3 Transfektanten ermittelt werden. Unabhängig von Cx43 Kanälen wurde das p53 Protein nach Bestrahlung gleichermaßen exprimiert. Balken: 40 μ m. * $p \leq 0,05$

Cx43 induzierte Jeg3 Transfektanten zeigten ebenfalls bereits 15 min nach Bestrahlung eine signifikante Hochregulation des p53 Proteins (Abb. 14E). Ähnlich wie bei den parentalen Jeg3 Zellen war die p53 Expression 30 min nach

Bestrahlung am höchsten. 1,5 Stunden nach Bestrahlung nahm die p53 Expression ab, wobei nach 24 Stunden die p53 Expression höher war als bei den unbestrahlten Kontrollzellen. In immunzytochemischen Färbungen zeigten die Cx43 induzierten Zellen 15 min nach Bestrahlung eine starke p53 Expression im Zellkern (Abb. 14G).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass parentale Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten eine ähnliche Kinetik für p53 nach Bestrahlung aufwiesen. Dabei spielte es keine Rolle, ob in den Cx43 Transfektanten die Cx43 Expression eingeschaltet war oder nicht. Bereits 15 min nach Bestrahlung mit 5 Gy wurde p53 Protein signifikant hochreguliert. Die höchste p53 Expression konnte sowohl in parentalen als auch in Jeg3 Cx43 Transfektanten 30 min nach Bestrahlung gemessen werden. Auch immunzytochemisch konnte in parentalen Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten p53 Protein im Zellkern nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die Cx43 uninduzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten einen besseren Verlauf des p53 Proteins nach Bestrahlung im Western Blot (Abb. 14C) als die Cx43 induzierten Zellen (Abb. 14E).

4.2.2 Expression von p21 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung

Als weiterer Marker für strahlungsinduzierte Bystander Effekte, wurde die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 in Jeg3 Zellen nach Bestrahlung untersucht. Die Expression von p21 wurde auf Proteinebene mit Hilfe der Western Blot Analyse untersucht. Dazu wurden Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten mit 5 Gy bestrahlt und anschließend die Proteine zu bestimmten Zeitpunkten bis zu 24 Stunden isoliert.

Im Gegensatz zu p53 war erst zwei Stunden nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung von p21 in parentalen Jeg3 Zellen festzustellen (Abb. 15A). Jeg3 Zellen zeigten bis zu 8 Stunden nach Bestrahlung einen starken Anstieg der p21 Expression. Danach war eine Sättigung der Proteinexpression festzustellen, so dass die Expression von p21 nach 24 Stunden schwach abnahm. Jedoch war der p21 Proteingehalt auch nach 24 Stunden im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle signifikant erhöht. Bei den Cx43 uninduzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster (Abb. 15B). Zwei Stunden nach Bestrahlung wurde das p21 Protein signifikant hochreguliert. Die hohen p21 Expressionswerte waren bis zu 24 Stunden messbar. Im Vergleich zu den parentalen Jeg3 Zellen

erfolgte nach 8 Stunden keine Abnahme der p21 Expression. Nach Induktion von Cx43 zeigten die Jeg3 Transfektanten im Gegensatz zu den uninduzierten Zellen erst 4 Stunden nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung des p21 Proteins (Abb. 15C). Die höchste p21 Protein Expression war für die Cx43 Transfektanten nach 24 h erreicht. Somit war 24 Stunden nach Bestrahlung eine Sättigung des Proteins in den Cx43 induzierten und uninduzierten Jeg3 Zellen nachweisbar. Zusammenfassend konnte (1) eine zeitlich verzögerte Expression von p21 im Vergleich zu p53 in allen Zelllinien festgestellt werden und (2) eine zeitliche Verzögerung in der p21 Aktivierung nach Induktion von Cx43 ermittelt werden.

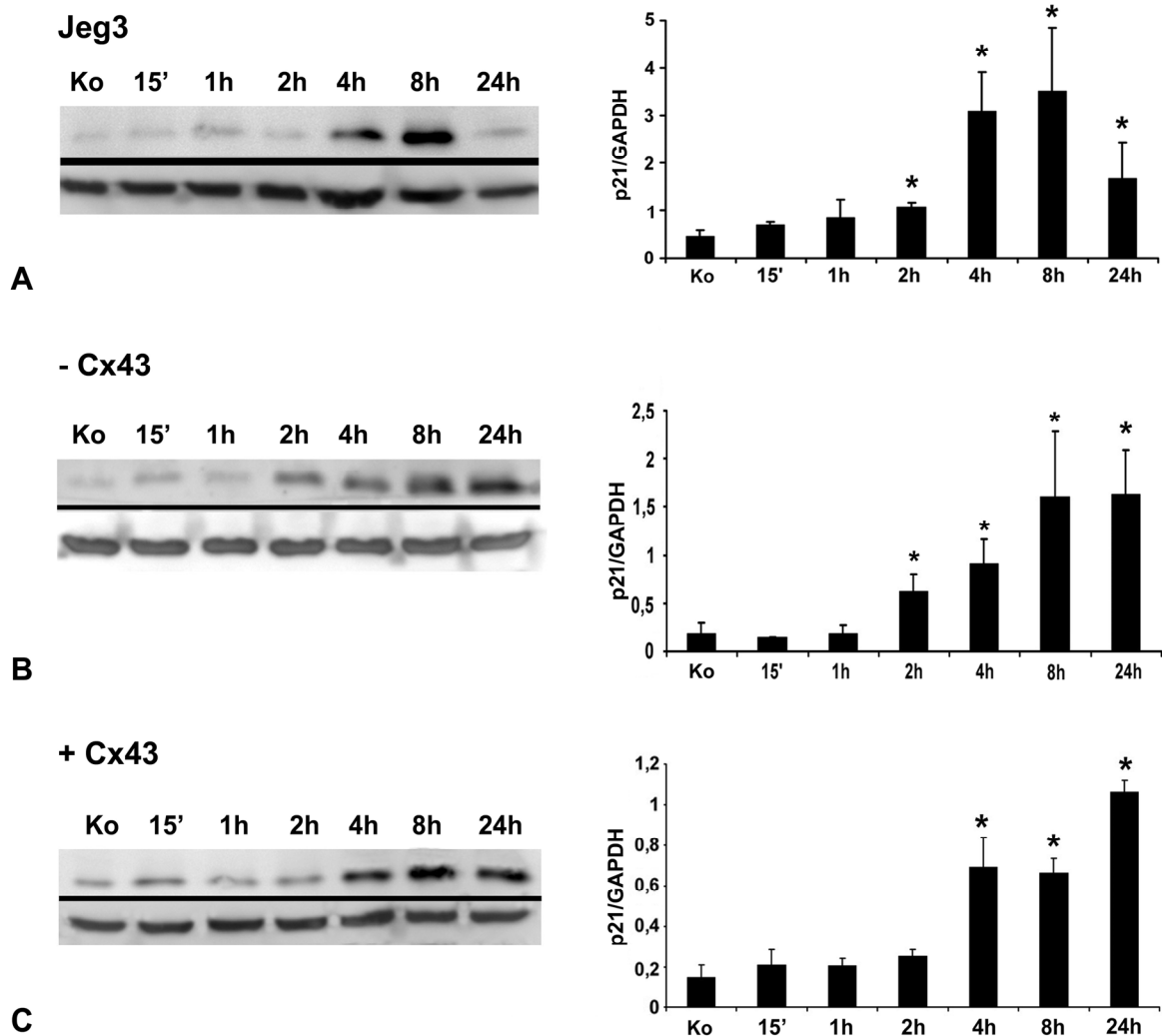


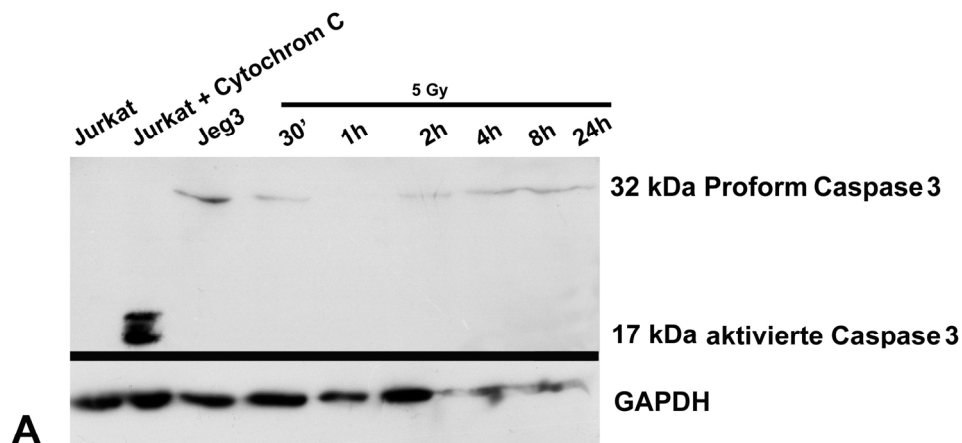
Abb. 15: Expression von p21 in parental Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung. (A, B) Western Blot Analysen zeigten, dass in parental Jeg3 Zellen und in Cx43 uninduzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten 2h nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung der p21 Expression nachzuweisen war. **(C)** In Cx43 exprimierenden Jeg3 Transfektanten wurde das p21 Protein erst 4 h nach Bestrahlung signifikant hochreguliert (n=3). Die densitometrische Auswertung zeigt die relative p21 Expression nach einem Abgleich gegen GAPDH. *p ≤ 0,05

4.2.3 Expression der aktivierten Caspase 3 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung

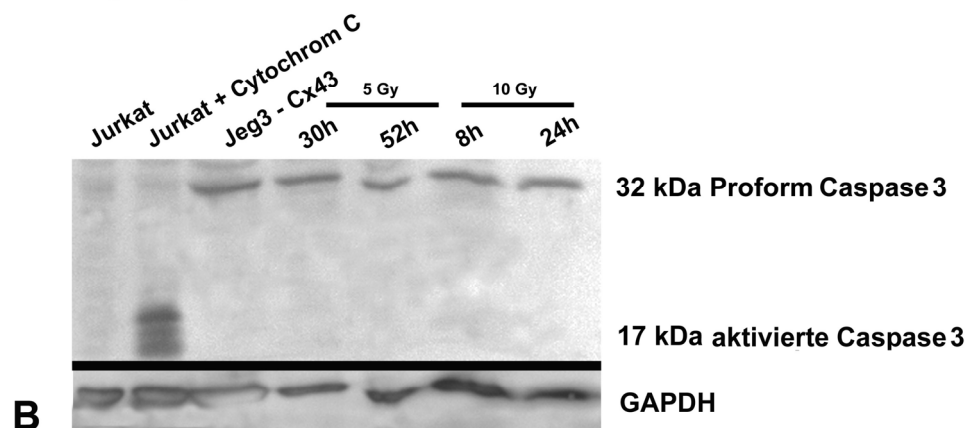
Die Caspase 3 Proteinexpression wurde zu bestimmten Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy im Western Blot untersucht. Es wurde sowohl das Proenzym (32 kDa) als auch die aktive Untereinheit der gespaltenen Caspase 3 (17 kDa) mit einem polyklonalen Antikörper detektiert. Zur Kontrolle wurden neben Jurkat Zellen, die mit Cytochrome C behandelt wurden und die aktivierte Form der Caspase 3 exprimieren, auch unbehandelte Jurkat Zellen aufgetragen (Abb. 16).

Nach Bestrahlung mit 5 Gy konnte keine aktivierte Caspase 3 Expression in parentalen Jeg3 und in Jeg3 Cx43 Transfektanten, unabhängig von der Expression der Cx43 Kanäle, gefunden werden. Es konnte lediglich die Proform der Caspase 3 bei 32 kDa bis zu 24 Stunden nach Bestrahlung nachgewiesen werden (Abb. 16A, B, C). Die aktivierte Form der Caspase 3 mit der Größe von 17 kDa konnte lediglich in den mit Cytochrom C behandelten Jurkat Zellen nachgewiesen werden. Um festzustellen, ob die Zeitspanne zur Aktivierung der Caspase 3 zu kurz war, wurden spätere Zeitpunkte nach Bestrahlung ausgewählt und die Proteine nach der Isolierung im Western Blot aufgetrennt. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass die Caspase 3 auch 52 Stunden nach Bestrahlung mit 5 Gy in Cx43 induzierten Jeg3 Transfektanten nicht aktiviert wurde (Abb. 16C). Auch nach Erhöhung der Strahlungsdosis auf 10 Gy und längeren Inkubationszeiten nach Bestrahlung (bis zu 48 h) zeigten die untersuchten Zellen keine Aktivierung der Caspase 3 (Abb. 16). Sowohl parentale Jeg3 Zellen als auch Cx43 exprimierende und nicht exprimierende Jeg3 Transfektanten bildeten keine aktivierte Caspase 3 nach Bestrahlung mit 5 Gy. Auch mit höheren Proteinkonzentrationen, längeren Inkubationszeiten und höheren Konzentrationen des Antikörpers konnte keine aktivierte Form der Caspase 3 in nach Röntgenbestrahlung festgestellt werden.

Jeg3



- Cx43



+ Cx43

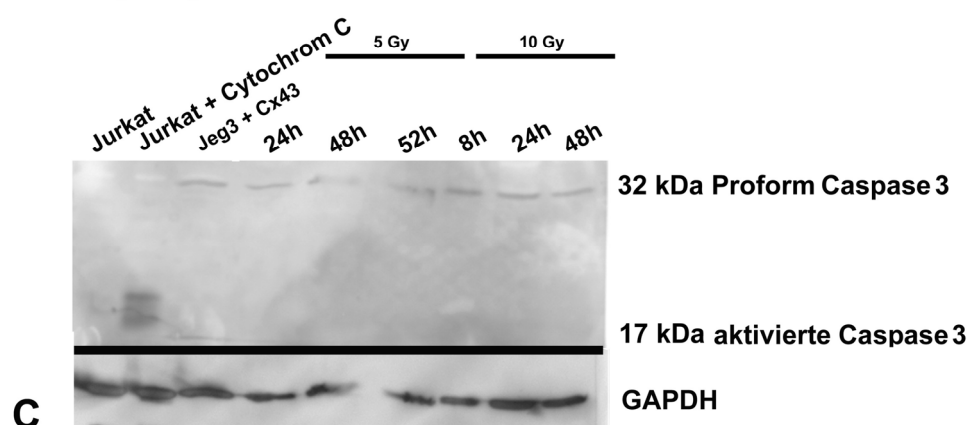


Abb. 16: Expression der aktivierten Caspase 3 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Röntgenbestrahlung. (A) Die Western Blot Analyse zeigte in parentalen Jeg3 Zellen keine aktivierte Form der Caspase 3 bis zu 24 h nach Bestrahlung. Nur in mit Cytochrom C behandelten Jurkat Zellen konnte die aktivierte Form der Caspase 3 nachgewiesen werden. **(B, C)** In Cx43 uninduzierten und Cx43 induzierten Jeg3 Transfektanten führten längere Inkubationszeiten und eine höhere Strahlungs-dosis von 10 Gy nicht zur Expression der aktivierten Caspase 3 auf Proteinebene. Es wurde lediglich die Proform der Caspase 3 exprimiert.

4.3 Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in Kokulturversuchen mit bestrahlten und unbestrahlten Jeg3 Zelllinien nach Röntgenbestrahlung

Zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurden Kokulturrexperimente mit bestrahlten und unbestrahlten Zellen durchgeführt. Als Markergen wurde p53 verwendet, da p21 erst relativ spät und Caspase 3 gar nicht nach Röntgenbestrahlung aktiviert wird. Dazu wurden unbestrahlte und ungefärbte Zellen mit 5 Gy bestrahlten und Dil gefärbten Zellen für vier Stunden kokultiviert und nach der Kokultivierung mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wieder nach bestrahlten und

unbestrahlten Zellen getrennt (Abb. 6). Die vierstündige Kultivierungszeit war für die Ausbildung von Zell-Zell Kontakten notwendig. Im Parallelansatz wurde die Kopplungsrate mit Hilfe der FACS-Analyse ermittelt. Zur Überprüfung der Reinheit der einzelnen Populationen nach der Zellsortierung, wurden die bereits getrennten Zellen noch mal mit der FACS-Analyse untersucht. Anschließend wurden die separierten Zellpopulationen im Western Blot auf die Expression des phosphorylierten p53 Proteins analysiert.

Parallel erfolgte eine Kokultivierung von Kontrollen mit Dil gefärbten und ungefärbten Zellen. Beide Zellpopulationen blieben unbestrahlt. Sie wurden nach vierstündiger Kokultivierung auf die gleiche Weise separiert wie die oben beschriebenen Zellen und die Aktivierung von p53 im Western Blot untersucht.

Um auszuschließen, dass der Versuchsansatz an sich bei den Zellen Stress und somit eine Aktivierung von p53 auslöst, wurden die folgenden Kontrollen durchgeführt. Dass die Dil Färbung keine Auswirkung auf die Aktivierung von p53 hat, zeigten die Zellen, die mit Dil gefärbt und sortiert wurden. Eine weitere Kontrolle stellten Dil gefärbte und mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlte Zellen dar. Der Zellzustand während des gesamten Versuches wurde mit Hilfe von Zellen überprüft, die im ganzen Versuchsablauf im Brutschrank inkubierten. Eine weitere Zellpopulation wurde mit zur Bestrahlungsanlage transportiert, um den Effekt des Transportes zu untersuchen. Diese Zellen wurden ebenfalls durch den Zellsortierer sortiert und im Western Blot auf die Induktion von p53 untersucht.

In dieser Arbeit wurden strahlungsinduzierte Bystander Effekte in parentalen Jeg3 Zellen, Jeg3 Cx43 und Jeg3 Cx26 Transfektanten analysiert. Jeg3 Cx26 Transfektanten wurden eingesetzt, um einen möglichen Einfluss einer anderen

Connexin Isoform als Cx43 bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten zu überprüfen.

4.3.1 Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in kokultivierten parentalen Jeg3 Zellen

Zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurden zunächst parentale, nicht transfizierte Jeg3 Zellen analysiert.

Die Ergebnisse der Western Blot Analyse für p53 der parentalen Jeg3 Zellen zeigten, dass der experimentelle Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Aktivierung von p53 hat. Im Einzelnen können die Ergebnisse wie folgt zusammengefasst werden: die Kontrollzellen, die zur Überprüfung des Versuchsablaufs mitgeführt wurden, wiesen lediglich bei den direkt bestrahlten und Dil gefärbten Zellen eine Erhöhung des phosphorylierten p53 Proteins auf (Abb. 17A). Es war deutlich zu erkennen, dass die ungefärbten Zellen, die zeitlich parallel im Brutschrank inkubierten und die zur Bestrahlungsanlage mitgeführten, unbestrahlten Zellen sowie die Dil gefärbten unbestrahlten Zellen nur einen Basiswert des p53 Proteins im Western Blot vorwiesen.

Ungefärbte, nicht bestrahlte Bystander Zellen, die zur Kontrolle mit unbestrahlten und Dil gefärbten Zellen für 4 Stunden kokultiviert wurden, zeigten nach der Sortierung nur geringe Mengen des p53 Proteins. Auch die unbestrahlten und Dil gefärbten Zellen der gleichen Kokulturpopulation zeigten nur eine schwache Aktivierung des p53 Proteins (Abb. 17B).

Die Analyse der einzelnen Kokulturgruppen untereinander zeigte, dass die mit 5 Gy direkt bestrahlten Zellen, wie erwartet, die stärkste p53 Expression von allen untersuchten Zellpopulationen vorwiesen. Unbestrahlte Bystander Zellen wiesen nach Kokultivierung mit direkt bestrahlten Zellen eine signifikante Erhöhung des p53 Proteins im Vergleich zu unbestrahlten Zellen, die mit unbestrahlten und Dil gefärbten Zellen kokultiviert wurden. Die Expression des p53 Proteins war in den unbestrahlten Zellen nach Kokultur mit bestrahlten Zellen 2,6fach höher als in den Kontrollkulturen. Damit konnte ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt in unbestrahlten Zellen nachgewiesen werden.

Die Reanalysen der sortierten Zellen demonstrierten eine klare Trennung der kokultivierten Zellpopulationen (Abb. 17C). Die ungefärbten Zellen aus der Kokultivierung mit Dil gefärbten Zellen waren im Durchschnitt zu 98,7% klar getrennt. Die Dil gefärbten Zellen aus derselben Kokultur wiederum zeigten eine

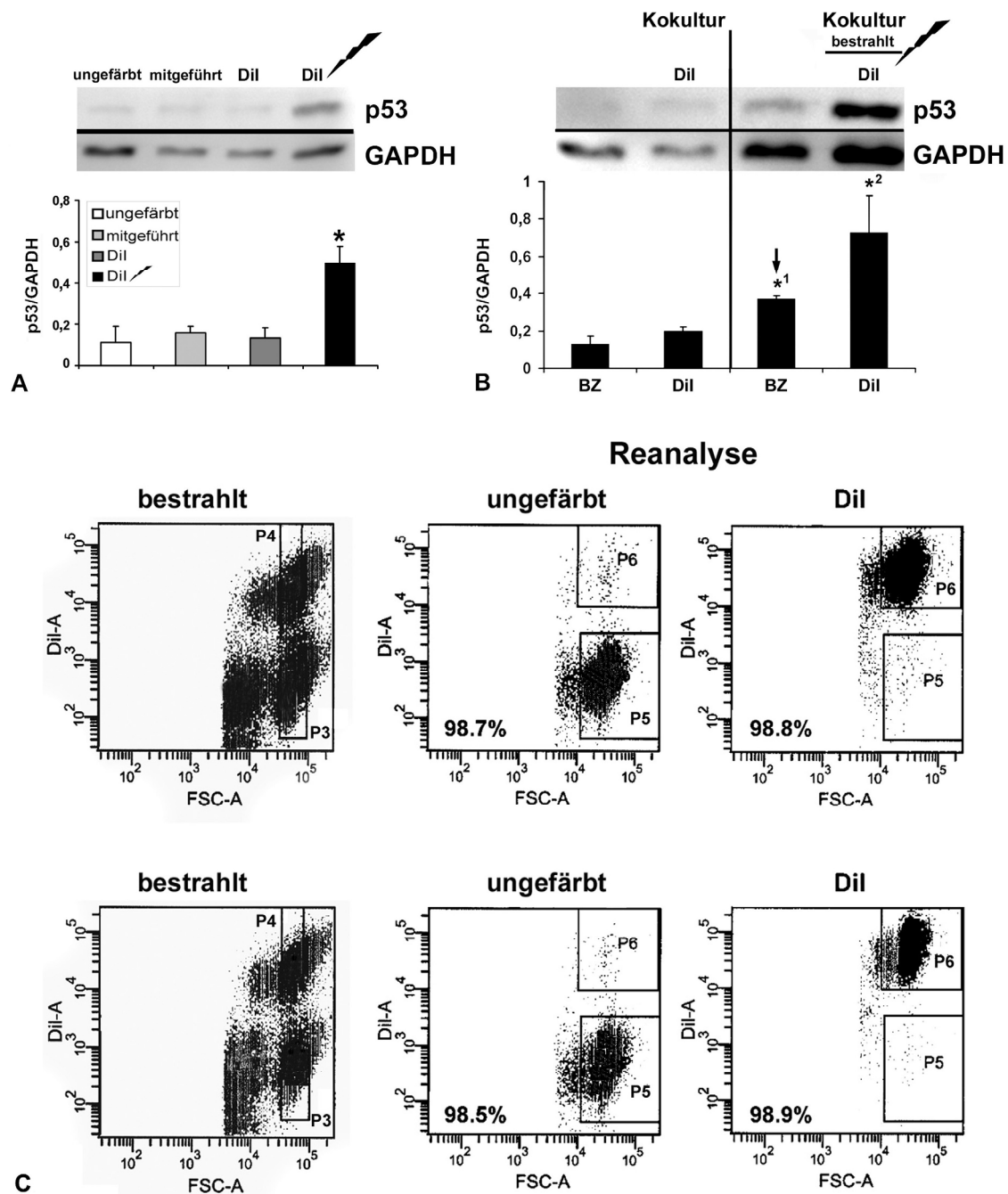


Abb. 17: Strahlungsinduzierter Bystander Effekt in parentalen Jeg3 Zellen. (A) p53 Protein Expression in Jeg3 Kontrollzellen. (B) Western Blot Analyse des phosphorylierten p53 Proteins in Jeg3 Zellen nach einer Kokultur für 4 h. Die unbestrahlten Bystander Zellen (BZ) (*¹) zeigten eine signifikante Erhöhung des p53 Proteins nach Kokultivierung mit direkt bestrahlten Zellen (*²). Im Gegensatz dazu konnte in BZ, die mit unbestrahlten Zellen kokultiviert wurden keine Aktivierung von p53 nachgewiesen werden. (C) FACS-Analyse der kokultivierten Zellpopulationen (P3, P4) mit der Reanalyse der jeweiligen separierten Populationen (P5, P6). X-Achse: repräsentiert den Forward Scatter (FSC-A) und die Y-Achse die Dil Fluoreszenzintensität. Messwerte geben die Mittelwerte \pm Standardabweichung an (n=3). *p \leq 0,05

Reinheit der Sortierung bis zu 98,8%. Die mit bestrahlten und Dil gefärbten Zellen kokultivierten Zellen wiesen eine im Schnitt 98,5%ige Reinheit der Sortierung auf. Nach der Kokultur waren die direkt bestrahlten Zellen wiederum zu 98,9% rein.

Zusammengefasst konnte eine Reinheit von $98,7\% \pm 0,17$ für parentale Jeg3 Zellen nach der Sortierung der kokultivierten Zellen ermittelt werden.

Die Kopplungseffizienz, die parallel zu den Kokulturversuchen analysiert wurde, betrug 2,2% und bestätigt die Kommunikationsdefizienz der Jeg3 Zellen (Abb. 9E). Zusammenfassend wurde festgestellt, dass ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt in parentalen Jeg3 Zellen in Kokulturversuchen mit bestrahlten und unbestrahlten Zellen nachgewiesen wurde.

4.3.2 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte in Abhängigkeit von der Cx43 Expression

Die Kokulturexperimente mit bestrahlten und unbestrahlten Jeg3 Cx43 Transfektanten sollten Aufschluss darüber geben, ob strahlungsinduzierte Bystander Effekte über Cx43 Kanäle vermittelt werden. Der Versuch wurde mit uninduzierten Transfektanten als auch nach Induktion von Cx43 im Vergleich durchgeführt. Es wurden zusätzliche Kontrollen, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben mitgeführt, um die Basisaktivität von p53 zu ermitteln. Die Kontrollen zeigten im Western Blot, dass die ungefärbten, die zum Bestrahlungsraum transportierten und die Dil gefärbten, unbestrahlten Zellen lediglich eine schwache p53 Expression aufwiesen (Abb. 18A). Diese Ergebnisse waren sowohl bei Cx43 uninduzierten, als auch die Cx43 induzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten nachzuweisen. Nur die direkt bestrahlten Zellen zeigten eine Hochregulation von phosphoryliertem p53 im Western Blot. Somit konnte gezeigt werden, dass der Versuchsansatz methodisch keine Aktivierung des p53 Proteins in Jeg3 Cx43 uninduzierten und Cx43 induzierten Zellen auslöst.

In den Bystander Zellen, die mit unbestrahlten Zellen für vier Stunden kokultiviert wurden, war nur eine schwache p53 Protein Expression nachzuweisen. Die Kultivierung der unbestrahlten Bystander Zellen mit direkt bestrahlten Zellen löste dagegen eine dreifache Erhöhung des phosphorylierten p53 Proteins in Jeg3 Cx43 uninduzierten Bystander Zellen im Vergleich zu den mit unbestrahlten Zellen kokultivierten Zellen aus.

In Cx43 uninduzierten Transfektanten wurde eine signifikante Erhöhung des phosphorylierten p53 Proteins in unbestrahlten Populationen nachgewiesen, die mit direkt bestrahlten Zellen für vier Stunden kokultiviert wurden. Durch Bestrahlung exprimierten die direkt bestrahlten Zellen am stärksten phosphoryliertes p53 Protein.

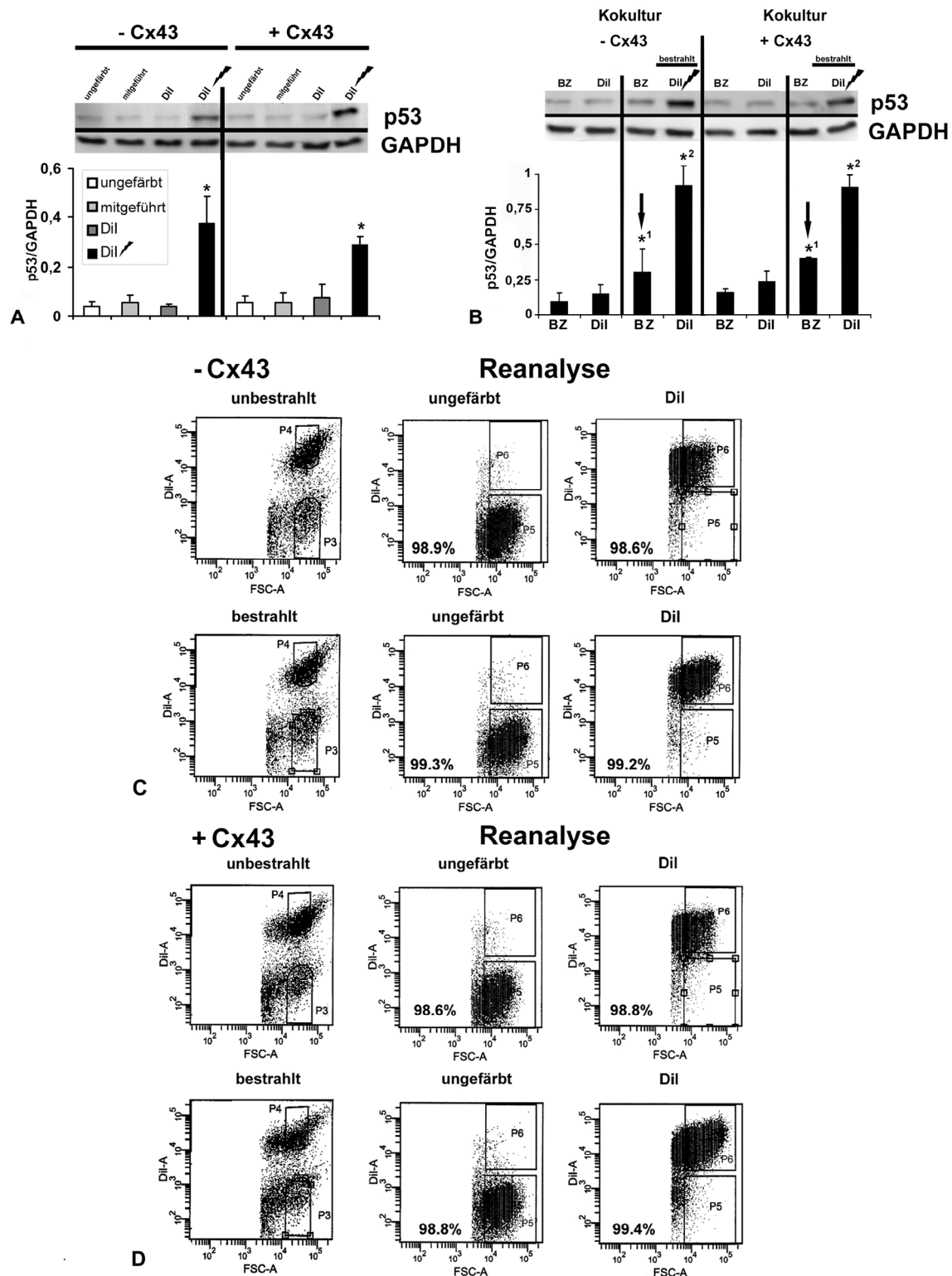


Abb. 18: Strahlungsinduzierter Bystander Effekt in Cx43 induzierbaren Jeg3 Transfektanten. (A) p53 Protein Expression in Cx43 uninduzierten (- Cx43) und induzierten (+ Cx43) Kontrollzellen. (B) Western Blot Analyse des phosphorylierten p53 Proteins in Cx43 induzierten und uninduzierten Zellen nach einer Kokultur für 4 h. Die unbestrahlten BZ (BZ = Bystander Zellen) (*¹) zeigten sowohl in Cx43 induzierten und uninduzierten Zellen eine signifikante Erhöhung des p53 Proteins nach Kokultivierung mit direkt bestrahlten Zellen (*²). Im Vergleich dazu wiesen BZ, die mit unbestrahlten Zellen kokultiviert wurden einen Basiswert für p53 vor. (C, D) FACS-Analyse der kokultivierten Zellpopulationen (P3, P4) mit der Reanalyse der separierten Populationen (P5, P6). X-Achse: repräsentiert den Forward Scatter (FCS-A) und die Y-Achse die Dil Fluoreszenzintensität (Dil-A). Messwerte geben die Mittelwerte \pm Standardabweichung an (n=4). *p \leq 0,05

Nach Induktion von Cx43 in Jeg3 Zellen wurde ebenfalls ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt nach Kokultivierung von unbestrahlten mit direkt bestrahlten Zellen nachgewiesen. Dieses wurde durch die signifikante Erhöhung des phosphorylierten p53 Proteins im Western Blot nachgewiesen (Abb. 18B). Bystander Zellen, die mit unbestrahlten Zellen kokultiviert wurden, bildeten geringe Mengen des p53 Proteins. Erst nach Inkubation der unbestrahlten Zellen mit direkt bestrahlten Zellen, exprimierten unbestrahlte Cx43 induzierte Jeg3 Zellen größere Mengen des p53 Proteins. Das p53 Protein war in den mit direkt bestrahlten kokultivierten Zellen im Vergleich zu den mit unbestrahlten Zellen kokultivierten um das 2,5fache erhöht.

Die Untersuchung der Reinheit der Sortierung zeigte, dass sowohl die Cx43 uninduzierten als auch die Cx43 induzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten eine Reinheit der Sortierung bis zu $98,9\% \pm 0,29$ vorwiesen (Abb. 18C, D).

Die Ergebnisse für Jeg3 Cx43 Transfektanten zeigten einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt in unbestrahlten, mit direkt bestrahlten kokultivierten Zellen. Dabei war die Weitergabe des Effektes unabhängig von Cx43 Kanälen. Somit kann gefolgert werden, dass der strahlungsinduzierte Bystander Effekt in Jeg3 Transfektanten nicht über Cx43 Kanälen vermittelt wird.

4.3.3 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte in Abhängigkeit von der Cx26 Expression

Zusätzlich zu den Jeg3 Cx43 Transfektanten wurden Jeg3 Zellen mit einem Cx26 Kanal für die Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten verwendet. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob möglicherweise strahlungsinduzierte Bystander Effekte über andere Connexin Isoformen als Cx43 Kanäle vermittelt werden.

Die Immunmarkierung von Cx26 zeigte nach Gabe von Doxyzyklin eine starke Expression des Cx26 Proteins entlang der Zellmembran. Uninduzierte Jeg3 Cx26 Transfektanten dagegen wiesen keine Cx26 Immunreaktion auf (Abb. 19A). Die Funktionalität der Cx26 Kanäle in Jeg3 Cx26 Transfektanten wurde mit Hilfe der FACS-Analyse bestimmt (Abb. 19B, C). Im Vergleich zu den Cx26 uninduzierten Jeg3 Zellen war die Kopplung für die Cx26 induzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten signifikant höher und betrug durchschnittlich $21\% \pm 0,05$ ($n=3$). Im Gegensatz dazu zeigten die Cx26 uninduzierten Transfektanten eine geringe bzw. keine Kopplung von $3,6\% \pm 0,005$ ($n=3$) (Abb. 19C).

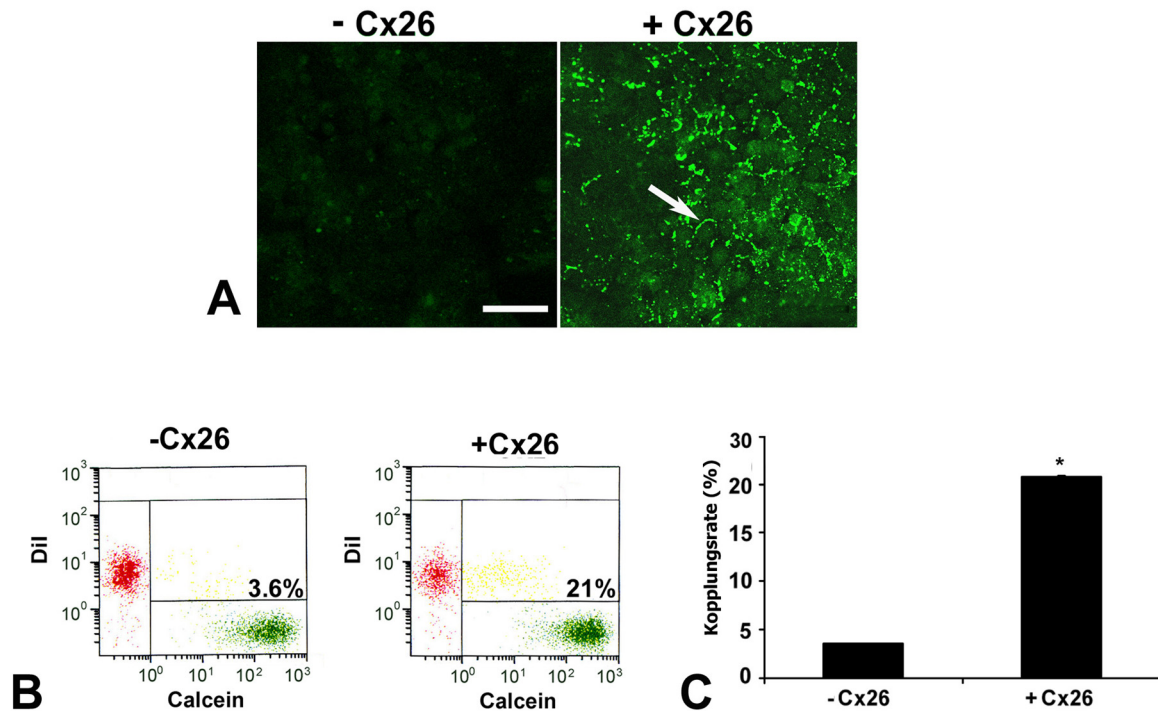


Abb. 19: Cx26 Expression in Jeg3 Cx26 Transfektanten. (A) Immunzytochemischer Nachweis von Cx26 vor und nach Induktion des Cx26 Proteins. Es ist eine durch Doxzyklin induzierbare Cx26 Protein Expression entlang der lateralen Zellmembran im Vergleich zum uninduzierten Zustand dargestellt (siehe Pfeil). (B, C) FACS-Analysen des Calcein Transfers wiesen eine signifikant höhere Kopplungsrate in Cx26 induzierten Jeg3 Zellen im Vergleich zu Cx26 uninduzierten Zellen vor (n=3). Balken: 40 μ m. *p \leq 0,05

Zur Überprüfung, welche Rolle Cx26 Kanäle bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten spielen, wurden auf die gleiche Weise wie in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 Kokultorexperimente mit bestrahlten und unbestrahlten Jeg3 Cx26 Transfektanten mit den entsprechenden Kontrollen durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde sowohl für kommunikationsdefiziente als auch für Cx26 exprimierende Zellen im Parallelansatz durchgeführt.

In Western Blot Analysen wurde in Kontrollen, die eine mögliche Regulation von p53 durch methodische Fehler zeigen sollten, nur in direkt bestrahlten Zellen eine signifikante Erhöhung des phosphorylierten p53 Proteins ermittelt. Die restlichen Kontrollen, d. h. die ungefärbten Zellen, die Dil gefärbten Zellen und die zur Bestrahlungsanlage mitgeführten Zellen exprimierten nur eine schwache p53 Protein Expression (Abb. 20A). Die Ergebnisse für die Cx26 uninduzierten und Cx26 induzierten Zellen waren identisch. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass das p53 Protein in Jeg3 Cx26 Transfektanten durch die Versuchsdurchführung aktiviert wurde.

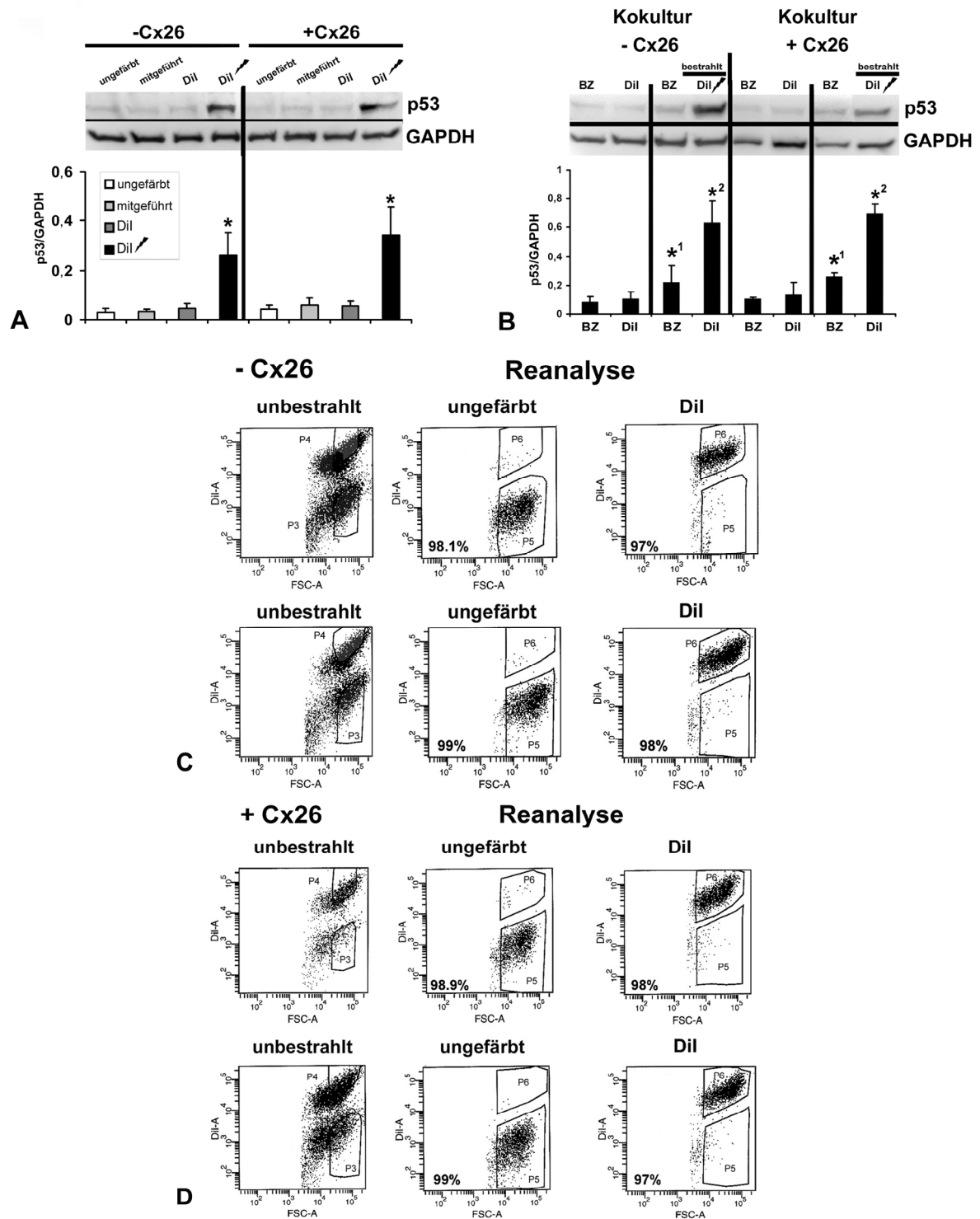


Abb. 20: Strahlungsinduzierter Bystander Effekt in Cx26 induzierbaren Jeg3 Transfektanten. (A) p53 Protein Expression in Cx26 uninduzierten (- Cx26) und induzierten (+ Cx26) Kontrollzellen. (B) Western Blot Analyse des phosphorylierten p53 Proteins in Cx26 induzierten und uninduzierten Zellen nach einer Kokultur für 4 h. Die unbestrahlten Kontrollzellen (BZ = Bystander Zellen) (*¹) zeigten sowohl in Cx26 induzierten und uninduzierten Zellen eine signifikante Erhöhung des p53 Proteins nach Kokultivierung mit direkt bestrahlten Zellen (*²) im Vergleich zu BZ, die mit unbestrahlten Zellen kokultiviert wurden. (C, D) FACS-Analyse der kokultivierten Zellpopulationen (P3, P4) mit der Reanalyse der separierten Populationen (P5, P6). X-Achse: repräsentiert den Forward Scatter (FSC-A) und die Y-Achse die Dil Fluoreszenzintensität. Messwerte geben die Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=4) an. *p \leq 0,05

Die Analyse des p53 Proteins nach Kokultivierung von bestrahlten und unbestrahlten Zellen in der Western Blot Analyse ergab für uninduzierte Jeg3 Cx26 Transfektanten, dass die unbestrahlten Bystander Zellen nach einer Kultivierung mit direkt bestrahlten Zellen einen signifikanten strahlungsinduzierten Bystander Effekt zeigten (Abb. 20B). Die ungefärbten Kontrollzellen wurden mit unbestrahlten Dil gefärbten Zellen kokultiviert. Diese ungefärbten Bystander Zellen und die Dil gefärbten unbestrahlten Zellen zeigten lediglich eine schwache p53 Proteinexpression in beiden Zellpopulationen nach einer vierstündigen Kokultivierungszeit.

Die Cx26 exprimierenden Zellen zeigten ähnlich wie kommunikationsdefiziente Jeg3 Zellen einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt, welcher durch den Nachweis des phosphorylierten p53 Proteins gemessen wurde. Auch in nicht kommunizierenden Zellen wurde in den unbestrahlten, die mit bestrahlten Zellen kokultiviert wurden, war eine schwache aber signifikante p53 Protein Expression nachzuweisen.

Die Reanalysen der bereits sortierten Zellen wiesen im Durchschnitt eine Reinheit von $98,2\% \pm 0,85$ (Abb. 20C, D). Somit konnte eine Vermischung der Populationen während der Sortierung ausgeschlossen werden.

Für Jeg3 Cx26 Transfektanten konnte ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt nachgewiesen werden, welcher unabhängig von der Expression von Cx26 Kanälen vermittelt wurde. Diese Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen für parentale Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten überein. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die im Rahmen dieser Arbeit analysierten strahlungsinduzierten Bystander Effekte weder über Cx26- noch über Cx43 Kanäle in Jeg3 Zellen vermittelt werden.

4.4 Untersuchung von Bystander Effekten nach Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen

Bei Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen sollten strahlungsinduzierte Bystander Effekte in einzelnen Zellen im Zellmonolayer untersucht werden. Dazu wurden mit der Mikrostrahlanlage der PTB einzelne Zellkerne mit einer definierten Anzahl von Teilchen in einer Zellpopulation bestrahlt. Nach Durchführung der Experimente wurden bestrahlte Zellen mit Hilfe eines Zellerkennungsprogramms wieder gefunden. Es sollten neben Langzeiteffekten nach vier Stunden, derselben Zeit

wie bei den Kokulturexperimenten, auch Kurzzeiteffekte bis zu einer Stunde nach Bestrahlung analysiert werden.

Für diese Untersuchungen wurden parentale Jeg3 Zellen sowie Jeg3 Cx43 Transfektanten eingesetzt. Nach Bestrahlung der Zellen sollte immunzytochemisch die Expression von phosphoryliertem p53 Protein in direkt bestrahlten und in unbestrahlten Zellen nachgewiesen und quantitativ analysiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für parentale Jeg3 Zellen und für Jeg3 Cx43 Transfektanten die Kultivierungsbedingungen auf Bestrahlungsträgern, der Nachweis der immunzytochemischen Färbung mit p53 und die quantitative Analyse der p53 Protein Expression etabliert.

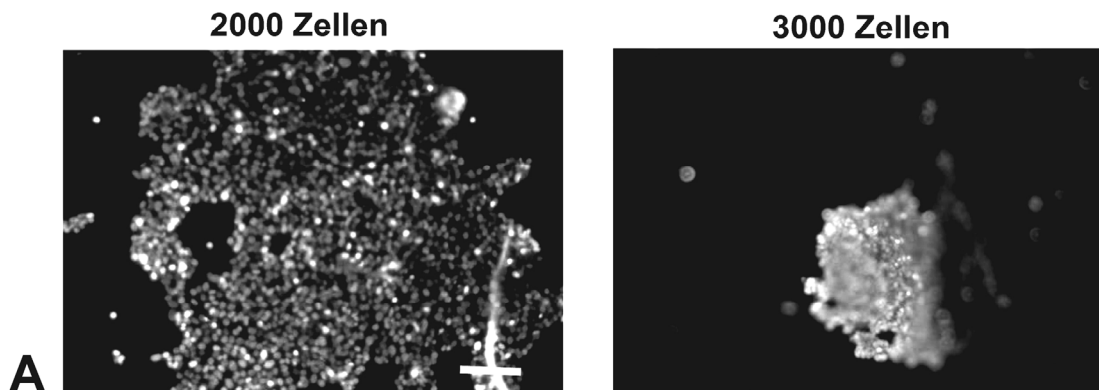
4.4.1 Etablierung der Kultivierungsbedingungen auf Bestrahlungsträgern zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen

Zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen wurde zunächst überprüft, wie viele Zellen auf Bestrahlungsträgern ausplattiert werden müssen, um eine optimale Dichte für Zell-Zell Kontakte zu gewährleisten. Die Vorversuche wurden mit Bestrahlungsträgern der PTB am Institut für Anatomie in Essen durchgeführt.

Zunächst wurde die optimale Zellzahl zur Durchführung der Einzelzellbestrahlungen bestimmt. Dazu wurden Jeg3 Zellen 24 Stunden vor der Durchführung der Einzelzellbestrahlungen auf Bestrahlungsträger in einer bestimmten Zelldichte ausplattiert. Damit sollte eine Kommunikation über Gap Junction Kanäle gewährleistet werden. Folgende Zellzahlen wurden ausgetestet: 500, 1500, 2000 und 3000 pro 3 μ l Zellkulturmedium. Die Zellkerne wurden vor der Bestrahlung mit dem Hoechst 33342 Farbstoff gefärbt. Die Färbung mit Hoechst 33342 ermöglichte es, dass die Position der Zellen für die Bestrahlung mit einer definierten Menge α -Teilchen durch das Computerprogramm erkannt werden konnten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

Die Biofolie der Bestrahlungsträger wurde vor dem Ausplattieren der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Poly-L-Lysin bewirkte, dass die Zellen im Gegensatz zu den nicht beschichteten Folien besser adhären konnten (Abb. 21B). Ab einer Zellzahl von 2000 Zellen pro 3 μ l Kulturmedium wurde ein konfluenten Monolayer auf den mit Poly-L-Lysin beschichteten Bestrahlungsträgern erzielt.

Bestrahlungsträger unbeschichtet



Bestrahlungsträger mit Poly-L-Lysin beschichtet

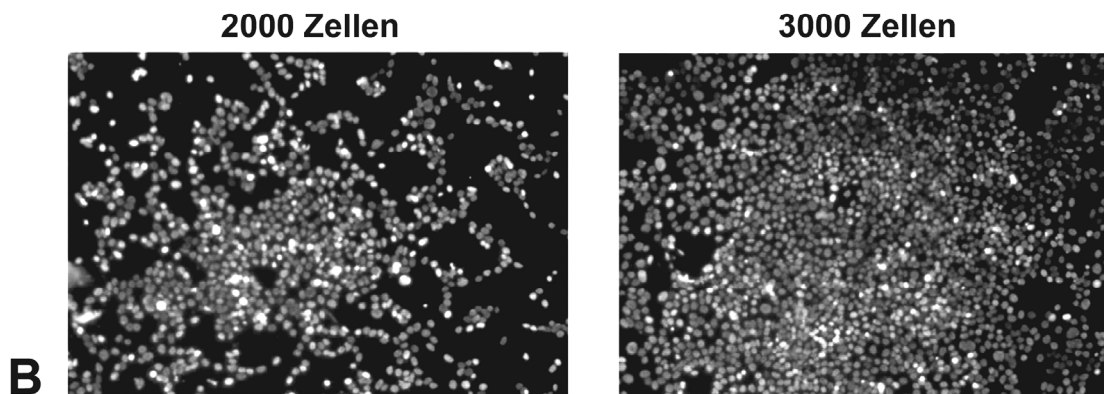


Abb. 21: Poly-L-Lysin Beschichtung der Bestrahlungsträger zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen mit α -Teilchen an der Mikrostrahlanlage. (A) Auf unbeschichteten Bestrahlungsträgern zeigten parentale Jeg3 Zellen unabhängig von der Zellzahl Anheftungsschwierigkeiten. **(B)** Nach Poly-L-Lysin Beschichtung und ab einer Zellzahl von 2000 Zellen pro 3 μ l Kulturmedium wuchsen Jeg3 Zellen im Monolayer. Balken: 180 μ m.

4.4.2 Etablierung der Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen und nachfolgender p53 Immunzytochemie

Für parentale Jeg3 und Jeg3 Cx43 Transfektanten wurden je Bestrahlungsträger jeweils 100%, 25% und 0% der Zellen mit 16 α -Teilchen bestrahlt. Die zu 100% bestrahlten Zellen stellten die Positivkontrolle und die nicht (0%) bestrahlten Zellen die Negativkontrolle für eine Versuchsdurchführung dar. Die Auswertung der zu 100%, 25% und 0% bestrahlten Zellen auf den Bestrahlungsträgern nach Durchführung der p53 Immunfärbung erfolgte am Mikroskop der Mikrostrahlanlage.

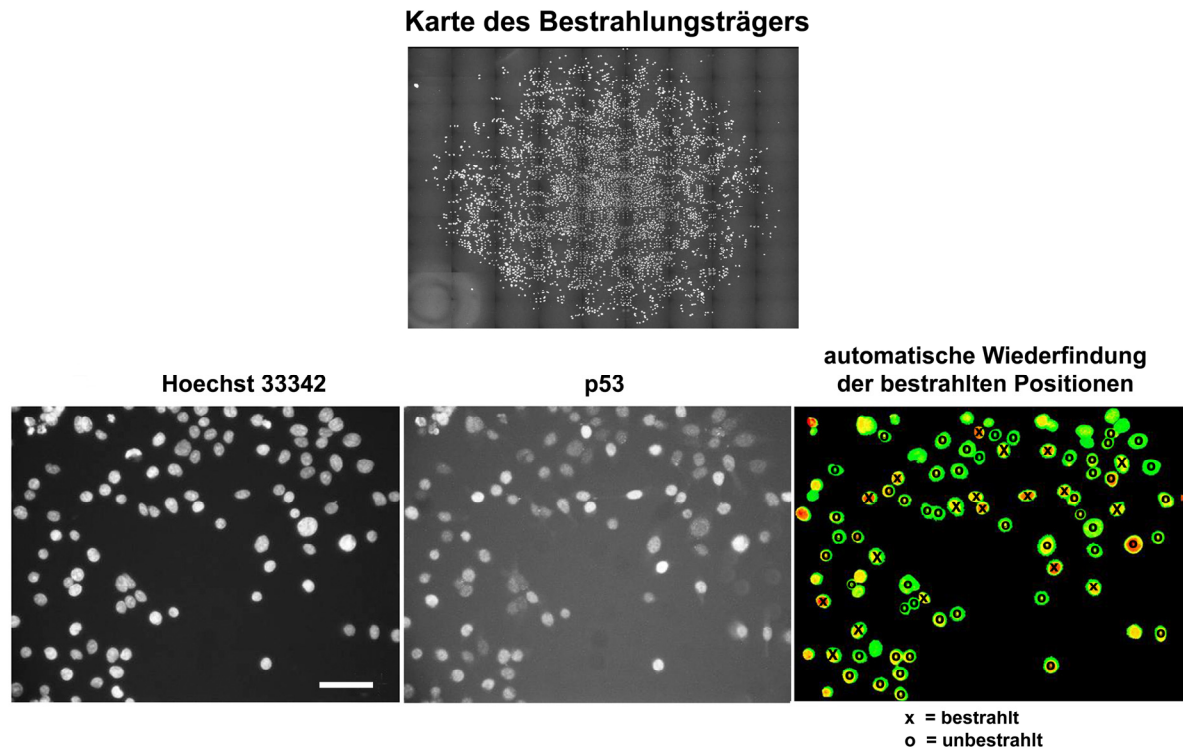


Abb. 22: Auswertung der p53 Expression nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen in parentalen Jeg3 Zellen. Die Karte der Bestrahlungsträgers zeigt den gesamten Bestrahlungsträger vor der Bestrahlung, welche aus ca. 100 Bildausschnitten besteht. Dargestellt sind die Zellkerne, die mit Hoechst 33342 gefärbt sind. Im unteren Abschnitt der Abbildung ist ein Ausschnitt der Karte aufgeführt. Neben der Hoechst33342 Färbung der Zellkerne vor der Bestrahlung ist derselbe Ausschnitt nach Bestrahlung und p53 Immunzytochemie dargestellt. Die automatische Wiederfindung der bestrahlten Positionen zeigt die mit 16 α -Teilchen bestrahlten Zellen (x) und die unbestrahlten Bystander Zellen (o). Balken: 40 μ m.

Dazu wurde der gesamte Bestrahlungsträger mit den Zellen zuerst für die Hoechstfärbung (Blaufilter) und anschließend für die p53 Färbung (Rotfilter) mit einer CCD-Kamera eingescannt (Abb. 22). Pro Bestrahlungsträger wurden 100 Bilder erfasst. Die bestrahlten Zellpositionen wurden mit dem Zellerkennungsprogramm markiert und die p53 Expression in diesen Zellen quantitativ ermittelt. Die Auswertung der Intensität der Immunmarkierung erfolgte mit einem *long distance* Fluoreszenzobjektiv. Das Computerprogramm zur Auswertung wurde von Dr. Klaus Greif, PTB entwickelt. So konnte die Fluoreszenz der immunzytochemische Färbung für p53 eingescannt und quantitativ analysiert werden.

4.4.3 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen von parentalen Jeg3 Zellen

Die Auswertung der aktivierten p53 Immunintensität nach Bestrahlung mit α -Teilchen wurde zuvor in Kapitel 3.11 beschrieben. Die quantitative Auswertung der Expression des phosphorylierten p53 Proteins nach immunzytochemischer

Färbung ergab tendenziell einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt für Träger auf denen nur 25% der Zellen bestrahlt wurden (Abb. 23). Dieses Ergebnis ist jedoch nicht signifikant. Die unbestrahlten Zellen wiesen eine 1,2fach erhöhte p53 Expression vor, als die unbestrahlten Kontrollen. Dabei wurde die über die Fläche des Bestrahlungsträgers verteilte Helligkeit der p53 Expression bestimmt (IOD = *integrated optical density* = über die Fläche integrierte Helligkeit). Die nicht bestrahlten parentalen Jeg3 Zellen zeigten eine zweifach geringere IOD als die Zellen, die zu 100% bestrahlt wurden (Abb. 23). Das bedeutet, dass die Expression von phosphoryliertem p53 Protein in bestrahlten Zellen, im Vergleich zu den Kontrollen mit unbestrahlten Zellen, signifikant erhöht war. Dieser Unterschied konnte quantitativ mit dem Computerprogramm festgestellt werden. Die Methode und die Auswertung von Einzelzellbestrahlungen an der Mikrostrahlanlage sind so weit etabliert, dass weitere Versuche durchgeführt werden können.

4.4.4 Strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen von Jeg3 Cx43 Transfektanten

Die Bestrahlung von einzelnen Zellen mit der Mikrostrahlanlage wurde parallel sowohl mit uninduzierten als auch nach Induktion von Cx43 in Jeg3 Transfektanten durchgeführt. Die über die Fläche des Bestrahlungsträgers verteilte Helligkeit der p53 Immunintensität für Bestrahlungsträger mit unbestrahlten Cx43 uninduzierten Jeg3 Transfektanten zeigte eine geringere IOD als die Bestrahlungsträger mit den zu 100% bestrahlten Zellen (Abb. 23). Die gemessene p53 Protein Expression war für die Bestrahlungsträger mit den zu 100% mit 16 α -Teilchen bestrahlten Zellen im Vergleich zu den Bestrahlungsträgern mit unbestrahlten uninduzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten signifikant erhöht. Die IOD war in den zu 100% bestrahlten Zellen um das 3,3fache im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen erhöht. In den nur zu 25% bestrahlten Zellen war eine höhere IOD in den direkt bestrahlten Zellen zu messen als in unbestrahlten Zellen auf dem gleichen Bestrahlungsträger (1,9fache Erhöhung). Das heißt, dass die Bestrahlung der Zellen zu 25% einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt in benachbarten unbestrahlten Cx43 uninduzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten auslöst. Dieser Effekt ist jedoch nicht signifikant.

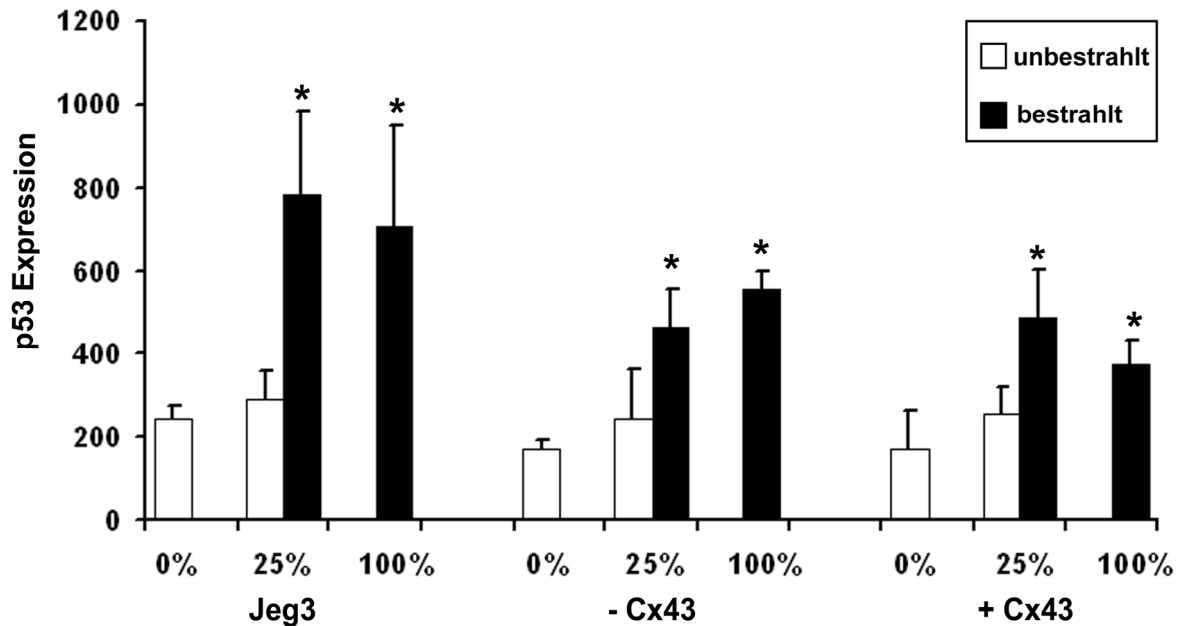


Abb. 23: Strahlungsinduzierter Bystander Effekt in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen. Die Zellen wurden jeweils zu 0, 25 und 100% pro Bestrahlungsträger mit 16 α -Teilchen bestrahlt. Im Vergleich zu den 0% bestrahlten Zellen zeigten parentale Jeg3 Zellen, sowie Cx43 uninduzierte und induzierte Jeg3 Transfektanten die zu 25% bestrahlt wurden eine höhere p53 Expression in unbestrahlten Bystander Zellen. Die höchste p53 Expression war in den zu 100% bestrahlten Zellen vorzufinden (n=5).

Nach Induktion von Cx43 zeigten die Jeg3 Zellen ein ähnliches Ergebnis wie die Cx43 Transfektanten nach Einzelzellbestrahlung mit 16 α -Teilchen (Abb. 23).

Auch nach Induktion der Cx43 Kanäle konnte eine signifikante Erhöhung der p53 Protein Expression in den zu 100% bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Die IOD war um das 2,2fache erhöht. Auffällig war, dass die p53 Protein Expression in Cx43 induzierten Jeg3 Cx43 Transfektanten um das 1,5fache geringer als in Cx43 uninduzierten Zellen war, wenn diese zu 100% bestrahlt wurden. Die Bestrahlungsträger, auf denen nur 25% der Zellen bestrahlt wurden, wiesen einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt in den unbestrahlten Zellen auf. Das bedeutet, dass die IOD in den unbestrahlten mit direkt bestrahlten Zellen um das 1,5fache erhöht war, als in den Zellen, die gar nicht bestrahlt wurden. Auch in Cx43 induzierten Jeg3 Zellen war die erhöhte p53 Expression in unbestrahlten, mit direkt bestrahlten Zellen kultivierten Bystander Zellen im Vergleich zu Kontrollen, die gar nicht bestrahlt wurden nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass strahlungsinduzierte Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit 16 α -Teilchen in Jeg3 Zellen, die mit Cx43

transfiziert wurden nachzuweisen waren, die jedoch unabhängig von der Expression von Cx43 Kanälen und somit von der Kommunikation über Gap Junction vermittelt werden.

Das erstmalig in dieser Arbeit verwendete Computerprogramm zur Auswertung der p53 Immunintensität nach Bestrahlung ermöglichte eine quantitative Untersuchung von Bystander Effekten nach immunzytochemischer Färbung des p53 Proteins. Es konnten bestrahlte von unbestrahlten Zellen unterschieden und Bystander Effekte analysiert werden.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der interzellulären Kommunikation über Gap Junction Kanäle bei der Vermittlung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten zu untersuchen.

Als Zelllinien wurde die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 eingesetzt. Jeg3 Zellen sind kommunikationsdefizient (Hellmann et al., 1996) und wurden daher stabil mit Hilfe des induzierbaren Tet-Genexpressionssystem mit verschiedenen Connexin Genen transfiziert (Gellhaus et al., 2004; Gossen und Bujard, 1992). Dadurch konnte die Connexin Expression über die Gabe von Doxyzyklin gezielt induziert werden und dadurch die zellphysiologischen Auswirkungen der Connexin Expression für strahlungsinduzierte Bystander Effekte in ein und demselben Zellsystem untersucht werden.

Da aus der Literatur bereits bekannt war, dass die Connexin Expression selber durch Strahlung moduliert werden kann (Azzam et al., 2003a), wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst überprüft, in wieweit die Expression von Cx43 Kanälen in Jeg3 Zellen durch Röntgenstrahlung beeinflusst wird.

Um einen geeigneten Marker für die Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten zu finden, wurde die Expression des Tumorsuppressorproteins p53, des Zellzyklusinhibitors p21 und auch des Apoptosemarkers aktivierte Caspase 3 nach Bestrahlung untersucht. In den mit 5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten und unbestrahlten Zellen in Kokulturen, konnte die Weitergabe von Bystander Effekten ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen mit der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung nach einer vierstündigen Kokultivierung nach bestrahlten und unbestrahlten Zellen separiert und anschließend quantitativ die Expression von p53 in den jeweiligen Populationen mit der Western Blot Methode überprüft. Zur Untersuchung von Kurzzeiteffekten und einer anderen Energiequelle nach Bestrahlung wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB) mit Hilfe einer Mikrostrahl Anlage einzelne Zellen in einem Zellmonolayer mit α -Teilchen bestrahlt. Nach einer 30 minütigen Kokultivierung von direkt bestrahlten und unbestrahlten Nachbarzellen wurde mit einem Computerprogramm die Expression von p53 nach immunzytochemischer Fluoreszenzfärbung automatisch bestimmt.

5.1 Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Connexin Expression in verschiedenen Zelllinien

Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten direkte Zell-Zell-Kontakte über Gap Junction Kanäle und speziell über Cx43, eine wesentliche Rolle spielen (Suzuki und Tsuruoka, 2004; Suzuki et al., 2004; Trosko et al., 1990). Azzam et al. konnten aber auch zeigen, dass nach Bestrahlung mit α -Teilchen die Cx43 Expression selber in Fibroblasten hochreguliert wird (Azzam et al., 2003a). Durch die Modulation der Cx43 Kanäle nach Bestrahlung kann die Weitergabe von Bystander Effekten beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst der Einfluss von Röntgenstrahlung auf die Connexin Expression bzw. Induktion in den Jeg3 Zelllinien analysiert und im Vergleich dazu andere verschiedene Zelllinien untersucht.

Auf Transkript- und Proteinebene konnte für bEnd3 und EA.hy926 Zellen eine starke Expression von endogenem Cx43 festgestellt werden. Zur Überprüfung der Funktionalität der induzierten Gap Junction Kanäle wurde der Kopplungsgrad mit Hilfe des Farbstoff-Transfer-Assays mit dem kanalgängigen Calcein in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie in modifizierter Form eingesetzt (Czyz et al., 2000; Tomasetto et al., 1993). Die Vorteile des Farbstoff-Transfer-Assays in Kombination mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie ist gegenüber der weit verbreiteten Methode der Mikroinjektion von Gap Junction permeablen Farbstoffen wie Lucifer Yellow, dass durch diese Analyse viele Zellen gleichzeitig innerhalb eines Zellklones analysiert werden können (Czyz et al., 2000). Zudem ist die Auswertung quantitativ erfassbar. Der Calcein Transfer Assay zeigte eine hohe Kopplungseffizienz von 95% in bEnd3 Zellen und 99% für EA.hy926 Zellen.

Wie schon beschrieben, exprimieren die bEnd3 Zellen Cx43 und Cx40 (Kwak et al., 2001). Die Cx43 Expression in EA.hy926 Zellen wurde erstmalig in dieser Arbeit sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene beschrieben (Banaz-Yasar et al., 2005). Jeg3 Zellen zeigten weder auf Transkript-, noch auf Proteinebene eine Connexin Expression. Zudem wiesen sie keine interzelluläre Kopplung auf. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse von Hellmann et al. (Hellmann et al., 1996). Nach Behandlung mit Doxzyklin wiesen die Jeg3 Cx43 Transfektanten eine stabile Expression der Cx43 Transkripte und Proteine im Gegensatz zur untransfizierten Kontrolle auf (Gellhaus et al., 2004). Die hohe Zellkopplungsrate

nach Induktion von Cx43 im Vergleich zu nicht induzierten Jeg3 Transfektanten stimmt ebenfalls mit bereits veröffentlichten Daten überein (Gellhaus et al., 2004). Nach Bestrahlung mit 5 Gy über einen Zeitraum bis zu 24 Stunden zeigten die bEnd3 Zellen eine Hochregulation von Cx43 Transkripten und Proteinen, wohingegen die humane Hybrid-Endothelzelllinie EA.hy926 auf Röntgenstrahlung mit einer kurzzeitigen Herunterregulation des Cx43 Transkripts reagierte. Auf Proteinebene konnte keine Modulation der Cx43 Expression für EA.hy926 Zellen nach Bestrahlung festgestellt werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen blieb die exogene Cx43 Expression in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung konstant. Weder auf Transkript- noch auf Proteinebene konnte eine Veränderung der exogenen Cx43 Expression nachgewiesen werden. Es erfolgte auch keine Induktion von endogenem Cx43. Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Modulation der Cx43 Expression nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen zellspezifisch ist.

Unsere Ergebnisse stimmen mit bereits veröffentlichten Arbeiten überein, in denen beschrieben wurde, dass die Cx43 Expression durch α - und γ -Strahlung modulierbar ist (Azzam et al., 2003a; Glover et al., 2003). Azzam et al. konnten zeigen, dass die Cx43 Expression sowohl in humanen Fibroblasten als auch in Leberepithelzellen vier Stunden nach Bestrahlung mit 1 bis 24 cGy α -Teilchen bzw. 6 Gy γ -Strahlen hochreguliert wird (Azzam et al., 2003a).

In bEnd3 Zellen konnte zudem eine Erhöhung der phosphorylierten Cx43 Bande gezeigt werden. Posttranslationale Modifikationen durch Phosphorylierung der Connexine sind eine Hauptantwort auf zellulären Stress. Die Phosphorylierung kann connexin- und gewebespezifisch erfolgen (Bruzzone et al., 1996). Sie stellt die wichtigste posttranslationale Proteinmodifikation mit regulatorischer Funktion dar, so dass den Zellen ermöglicht wird, auf extrazelluläre Signale zu reagieren. Durch die Phosphorylierung werden Gap Junction-Kanäle stabilisiert (Laird, 2005; Lampe und Lau, 2000). Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Connexine nimmt einen Einfluss auf das „*Protein-Trafficking*“, d.h. den Zusammenbau sowie den Abbau der Connexine. Azzam et al. gehen in ihrer Arbeit davon aus, dass die Phosphorylierung von Cx43 in gestressten Zellen nach der Proteinsynthese erfolgt (Azzam et al., 2003a). Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Hochregulation des Cx43 Proteins nach Bestrahlung durch *de novo* Proteinsynthese erfolgt. Dies

könnte eine mögliche Erklärung für die Hochregulation von Cx43 in bEnd3 Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen sein.

Zur Überprüfung, ob Röntgenstrahlung einen Einfluss auf die Funktionalität der Gap Junction Kanäle hat, wurde der Transfer des Gap Junction gängigen Calceins in bEnd3 und in EA.hy926 Zellen analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass bEnd3 Zellen sowohl im unbestrahlten als auch im bestrahlten Zustand eine starke interzelluläre Kommunikation vorweisen. Der Kopplungsgrad nach Bestrahlung korrelierte in bEnd3 Zellen nicht mit der signifikanten Hochregulation von endogenem Cx43 nach Bestrahlung. Vermutlich war bereits in den unbestrahlten Kontrollzellen die Kopplungseffizienz im Sättigungsbereich, so dass keine weitere Erhöhung der Kopplung messbar war. Eine andere Erklärung könnte die intrazelluläre Akkumulation des Cx43 Proteins sein, so dass weniger Connexin Protein in die Membran eingebaut wird und somit keine weiteren funktionellen Gap Junction Kanäle gebildet werden. Weitere Befunde anderer Gruppen unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit. Liu et al zeigten, dass in Maus Epidermiszellen eine Erhöhung von Cx43 nach sieben tägiger Röntgenbestrahlung mit 3 Gy immunhistochemisch nachzuweisen war (Liu et al., 1997). Eine Erhöhung der Cx43 Expression nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen konnte auch in Ratten Alveolar-Epithelzellen sowohl immunzytochemisch als auch in Western Blot Analysen detektiert werden (Kasper et al., 1996). In bisherigen Veröffentlichungen wurde die Hochregulation von Cx43 nach Bestrahlung mit Hilfe der Western Blot Methode oder immunzytochemisch nachgewiesen. Über die Funktionalität der Cx43 Kanäle und den Grad der Kopplung nach Bestrahlung, so wie sie in dieser Arbeit untersucht wurde, ist bisher nichts bekannt.

Im Gegensatz zu bEnd3 Zellen zeigte sich in EA.hy926 Zellen die Reduktion der Cx43 Transkriptmenge nach Bestrahlung weder in der Proteinexpression noch in der Kopplungseffizienz dieser humanen Endothelzellen. Da die Cx43 mRNA Expression in EA.hy926 Zellen nach 8 Stunden wieder regeneriert war, war möglicherweise die Zeit zu kurz, um eine Modulation des Cx43 Proteins und somit der Kopplungseffizienz zu erreichen. Die Herunterregulation der Connexine als Antwort auf strahleninduzierten Stress sind bisher nicht beschrieben worden. Ob die Herunterregulation des endogenen Cx43 Transkripts in EA.hy926 Zellen physiologische Auswirkungen auf die Zellen hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen. In Jeg3 Cx43 Transfektanten zeigte die Untersuchung von Modulationen

der Cx43 Expression nach Bestrahlung mit 5 Gy keine Veränderung der exogenen Cx43 Transkript- und Proteinexpression. Da es sich bei der Transfektion um einen viralen Promoter (*minimal immediate early* Promoter des humanen Cytomegalovirus) handelt, war eine Modulation des exogenen Cx43 auch nicht zu erwarten. Jeg3 Cx43 Transfektanten zeigten aber auch keine Induktion des endogenen Cx43 nach Bestrahlung. Dies steht im Gegensatz zu einer Arbeit von Azzam et al., die die Aktivierung von endogenem Cx43 in einer kommunikationsdefizienten Leber Epithelzelllinie nach Bestrahlung mit α -Teilchen zeigen konnten (Azzam et al., 2003a).

Mögliche Ursachen für Modulationen der Cx43 Expression in bEnd3 Zellen und in EA.hy926 Zellen nach Röntgenbestrahlung könnte die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an den Cx43 Promotor binden, sein. Die Cx43 Promotor-Region beinhaltet Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor NF κ B (Echetebeu et al., 1999), AP-1 (*activating protein-1*) (Geimonen et al., 1996) und ATF2 (*activating transcription factor 2*) (Bailey et al., 2002). Azzam et al. zeigten, dass der Transkriptionsfaktor NF κ B, AP-1 und ATF2 durch die Bestrahlung mit α -Teilchen signifikant aktiviert werden kann (Azzam et al., 2002). Promotor-Studien von Cx43 zeigten in humanen Fibroblasten und in HeLa Zellen, dass ionisierende Strahlung die Expression des humanen Cx43 induziert. Dabei wurde festgestellt, dass die Induktion des Cx43 Promotors sowohl dosis- als auch zeitabhängig ist (Glover et al., 2003).

Da in Jeg3 Cx43 Transfektanten die Cx43 Expression nach Bestrahlung nicht moduliert wurde, eigneten sich die Jeg3 Cx43 Transfektanten für die Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen die Modulation von Cx43 von der verwendeten Zelllinie abhängig ist. Zur Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten muss jede Zelllinie vorher auf mögliche Modulationen der Connexin Expression nach Bestrahlung untersucht werden, um einen möglichen Einfluss der Connexin Expression auf die Modulation von Bystander Effekten auszuschließen.

5.2 Einfluss von Röntgenstrahlen auf die p53, p21 und Caspase 3 Expression in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy

Um einen geeigneten Marker zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten zu finden, wurde in dieser Arbeit die p53, p21 und Caspase 3

Expression in parentalen Jeg3 und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy untersucht. Für die Auswahl eines geeigneten Markergens war es wichtig, dass die Expression möglichst kurz nach der Bestrahlung hochreguliert wurde. p53 und p21 wurden als schnell reagierende Stressmarker verwendet. Die Untersuchung der Expression der Caspase 3 sollte anzeigen, ob die Zellen durch die Bestrahlung in die Apoptose gehen und ob die aktivierte Caspase 3 ein geeigneter Endpunktmarker sein könnte. Weitere gängige Marker zur Untersuchung von Bystander Effekten sind γ -H2AX Foci und Mikronukleibildung, die in der Regel immunzytochemisch nachgewiesen werden. Der Nachteil der Anwendung dieser Marker ist, dass γ -H2AX Foci und auch Mikronuklei manuell gezählt werden und somit subjektiv ausgewertet werden (Azzam und Little, 2004). Es kann somit auch keine quantitative Aussage über die Expression dieser Proteine gemacht werden. Die in dieser Arbeit angewandte Western-Blot-Methode hingegen ermöglicht, dass die Expression der Proteine quantifiziert werden kann.

Eine Aktivierung von p53 nach Bestrahlung zeigte sich durch eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15. Dies konnte mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers für phosphoryliertes p53 analysiert werden. Phosphoryliertes p53 sowie p21 werden als Marker zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten verwendet. Das p53 Protein ist ein zentraler Regulator des Zellzyklus und der Apoptoseinduktion nach Schädigung der DNA (Oren, 1999). Nach Röntgenbestrahlung kann in Zellen Apoptose ausgelöst werden, indem zunächst p53 phosphoryliert und somit aktiviert wird. Aus der Literatur sind nur wenige Arbeiten zu p53 im Zusammenhang mit strahlungsinduzierten Bystander Effekten bekannt (Azzam et al., 1998; Azzam et al., 2001). p53 ist ein Schlüsselprotein, welches DNA-Reparatur durch die Induktion des Zellzyklusarrests und/oder den apoptotischen Zelltod aktiviert. Nach Bestrahlung wird p53 durch die ATM-Kinase Aktivierung stabilisiert. Dabei interagiert das p53 Bindeprotein 1 (p53 BP-1 = *p53 binding protein 1*) mit p53 und löst hunderte von Phosphorylierungen an DNA-Doppelstrangbrüchen aus. Das p53BP1 wird ebenfalls durch ATM reguliert (Turesson et al., 2003).

p53 wurde sowohl in parentalen Jeg3 Zellen als auch in Jeg3 Cx43 Transfektanten, unabhängig ob Cx43 Kanäle induziert waren oder nicht, nach Bestrahlung hochreguliert. Das phosphorylierte p53 Protein wurde bereits 15 min

nach Bestrahlung signifikant hochreguliert, wobei nach 30 min die maximale p53 Expression erreicht war. Bis zu 24 h nach Bestrahlung war der erhöhte p53 Proteingehalt in den untersuchten Zellen nachweisbar. Immunzytochemische Färbungen zeigten nach Bestrahlung eine Akkumulation des p53 Proteins im Zellkern. Die Aktivierung von p53 ist eine Konsequenz der DNA Schäden in der Zelle (Fei und El-Deiry, 2003; Hutchinson, 1985). Es ist bekannt, dass die in dieser Arbeit verwendete Strahlungs-dosis von 5 Gy in Zellen zu DNA-Strangbrüchen führen und Apoptose auslösen kann. Gleichwohl reagiert jeder Zelltyp anders auf die Dosis von 5 Gy Röntgenstrahlen. Zellulärer Stress und daraus resultierende Apoptose wird durch Faktoren wie Hitze, Bestrahlung, Hypoxie, Entzündung, Verletzung und exzessive Muskelarbeit ausgelöst (Arnold und Kadenbach, 1999). Als weiteres Markergen für strahlungsinduzierte Bystander Effekte wurde der Zellzyklusinhibitor p21 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nach Bestrahlung mit 5 Gy untersucht. Im Gegensatz zu p53 wurde p21 erst 2-4 Stunden nach Bestrahlung hochreguliert. Unsere Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Fournier et al. überein (Fournier et al., 2004). Fournier et al. berichten, dass p53 und p21 in humanen Fibroblasten nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen unterschiedliche Kinetiken aufweisen. Nach Bestrahlung wird p53 bereits nach 30 und p21 3-6 Stunden nach Bestrahlung hochreguliert. Dabei wurde festgestellt, dass die Hochregulation von p53 und p21 sowohl von der Strahlungs-dosis als auch von der Strahlungsart abhängt. Die verzögerte Aktivierung von p21 kann daran liegen, dass p21 durch p53 aktiviert wird (Ewen und Miller, 1996; Reinke und Lozano, 1997). Als Konsequenz von Bestrahlung wird p53 Protein in der Zelle akkumuliert und führt über die transkriptionelle Aktivierung von p21 zum vorübergehenden Zellzyklusarrest in der G1-Phase, in der die DNA-Reparatur ermöglicht wird. p21 kann auch die Apoptose einleiten (Little und Nagasawa, 1985). Auffällig ist, dass nach Induktion von Cx43 in Jeg3 Transfektanten p21 erst später aktiviert wird als in Cx43 uninduzierten, nicht kommunizierenden Jeg3 Zellen. Diese Beobachtung bestärkt die Theorie, dass kommunizierende Zellen geschützter vor Strahlung sind, als nicht kommunizierende Zellen (Hamada et al., 2003; Knedlitschek et al., 1990). Da die Aktivierung von p21 in parentalen Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten erst nach 2-4 Stunden erfolgte, eignete sich p21 nicht als Marker zur Untersuchung von Bystander Effekten in Kokultursversuchen. Die Kultivierungszeit

von bestrahlten und unbestrahlten Zellen für 4 Stunden war möglicherweise zu kurz, um eine mögliche Induktion des p21 Proteins in unbestrahlten Zellen zu detektieren.

Die Untersuchung der aktivierten Caspase 3 als Endpunkt der Apoptose zeigte jedoch keine Expression in parentalen Jeg3 Zellen sowie in Jeg3 Cx43 Transfektanten. Es konnte lediglich die inaktive Proform der Caspase 3 in den Zellen nachgewiesen werden. Auch nach längeren Inkubationszeiten bis zu 48 Stunden nach Bestrahlung und höheren Strahlungsdosen von 10 Gy konnte keine Aktivierung der Caspase 3 in Jeg3 Zellen detektiert werden. Parentale Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten sahen nach Röntgenbestrahlung morphologisch unverändert aus und ein Zellsterben konnte nicht beobachtet werden. Da die Zellen keine aktivierte Caspase 3 bildeten, kann davon ausgegangen werden, dass möglicherweise der Zellzyklusarrest über p53 induziert wurde.

Die Beteiligung von Caspasen in der strahlungsinduzierten Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert, obwohl die Caspase Aktivierung eine Antwort auf ionisierende Strahlung sein kann. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aktivierung von Caspasen nach Bestrahlung zellspezifisch ist (Chauhan et al., 1997; Eichholtz-Wirth und Marx, 1998; Hallan et al., 1997; Woo et al., 1998; Yu und Little, 1998). Eine Aktivierung der Caspase 3 nach Bestrahlung konnte in Lymphozyten und in Myeloma Zellen detektiert werden, wohingegen in HeLa Zellen und in embryonalen Stammzellen nach γ -Bestrahlung keine Aktivierung nachgewiesen wurde. Ferrer berichtete, dass nach Bestrahlung des Cerebellums von Ratten Caspase 3 in Gliazellen zwar aktiviert wird, aber dass strahlungsinduzierte Apoptose nicht Caspase abhängig ist (Ferrer, 1999). Die Induktion der Apoptose erfolgt möglicherweise über andere Wege. Auch in der Arbeit von Michelin et al. wurde die Bedeutung von Caspase 3 in primären Zellkulturen aus Rattengehirnen nach γ -Bestrahlung mit 0,1-4 Gy untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Caspase 3 vier bis sechs Stunden nach Bestrahlung mit 3 Gy aktiviert wurde (Michelin et al., 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Caspase 3 in Jeg3 Zellen nach Bestrahlung nicht erfolgt und daher keine Rolle bei der zellulären Antwort auf Röntgenstrahlen spielt.

Zur Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurde daher phosphoryliertes p53 als Marker für strahlungsinduzierte Bystander Effekte in

Kokulturbedversuchen verwendet, da bereits 15 min nach Bestrahlung eine signifikante Hochregulation von p53 im Gegensatz zu p21 und Caspase 3 in Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten nachzuweisen war.

5.3 In Jeg3 Zellen sind Bystander Effekte unabhängig von der intrazellulären Kommunikation über Gap Junctions sowie von der Connexin Isoform

Die Weitergabe von Bystander Effekten kann über Gap Junctions und/oder parakrin über lösliche Faktoren erfolgen (Azzam et al., 1998; Azzam et al., 2001; Bishayee et al., 2001; Mitchell et al., 2004a; Nagasawa et al., 2002; Shao et al., 2003a). Ob strahlungsinduzierte Bystander Effekte über Connexin Kanäle und/oder über die Beteiligung löslicher Moleküle vermittelt werden, ist zur Zeit Gegenstand intensiver Studien (Hall, 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Inkubation von unbestrahlten Zellen mit dem Medium von bestrahlten Zellen, biologische Effekte in unbestrahlten Bystander Zellen auslösen können (Azzam et al., 2003b). Der Bystander Effekt kann maligne Transformationen in gesunden Zellen auslösen, wenn diese Zellen in der Umgebung von bestrahlten Tumoren sind. Daher kann Bestrahlung ein Risikofaktor für gesunde Zellen bzw. Gewebe darstellen. Bisherige Analysen zu strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurden lediglich an Zellkulturen durchgeführt. Gleichwohl wurde bereits in den frühen 50er Jahren berichtet, dass nach der Röntgenbestrahlung der Milz von Tumorpapienten Veränderungen im Rückenmark festgestellt wurden. Ebenso wurde im Jahre 1968 bei Papienten, die Plasma von bestrahlten Tumorpapienten erhalten hatten, Beschädigungen der Chromosomen festgestellt (Osterreicher et al., 2003). Jedoch spielen neben interindividuellen Unterschieden auch genetische Faktoren, wie Defekte im DNA-Reparaturmechanismus, bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten *in vivo* eine Rolle (Littlefield et al., 1969; Mothersill et al., 2001). Bis heute sind die Weitergabe und der Signalweg von Bystander Effekten nicht bekannt und bedürfen daher weiterer Untersuchungen. Zur Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurden in dieser Arbeit Kokulturbedexperimente mit ungefärbten, nicht bestrahlten und Dil gefärbten und bestrahlten Zellen durchgeführt. Die einzelnen Populationen wurden mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie getrennt. Diese experimentelle Vorgehensweise wurde zum Teil in einer Arbeit von Gerashenko und Howell beschrieben (Gerashchenko und Howell, 2003). Zur sauberen Trennung der einzelnen kokultivierten Zellpopulationen wurden enge *cut off* Kriterien, wie

Zellgröße und Granularität angewandt. Das heißt, es wurden beispielsweise zu große Zellen aus der Auswertung ausgenommen, da diese Zellen möglicherweise Zellverklumpungen darstellen und eine Verunreinigung verursachen könnten. Um dennoch Mischungen der einzelnen Zellpopulationen auszuschließen, wurden zusätzlich Reanalysen der bereits sortierten Zellen durchgeführt, das heißt die Populationen wurden nochmals mittels Durchflusszytometrie analysiert. Somit konnte gezeigt werden, dass die Populationen im Schnitt zu 99 % reine Zellen enthielten.

Um die Aktivierung von p53 durch andere Stressfaktoren, wie z.B. Temperaturschwankungen und/oder Erschütterungen, als durch Bestrahlung auszuschließen, wurden zusätzlich zu den unbestrahlten Kontrollzellen, die ebenfalls wie die bestrahlten Zellen für vier Stunden kokultiviert wurden, verschiedene Kontrollen durchgeführt.

Zur Klärung, ob strahlungsinduzierte Bystander Effekte über Gap Junction Kanäle an unbestrahlte Zellen weitergegeben werden, wurde in dieser Arbeit mit dem Doxyzyklin induzierbaren Tetrazyklin System gearbeitet. Durch die Möglichkeit Connexin Kanäle an- und ausschalten zu können, war es möglich, den Einfluss von Connexin Kanälen bei der Weitergabe von Bystander Effekten direkt in einem Zellklon zu untersuchen. Eine mögliche Modulation des Bystander Effektes durch Connexin Isoformen, wurde durch den Einsatz von Cx43 und Cx26 induzierbaren Jeg3 Transfektanten untersucht.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal generell ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt in der malignen Trophoblastzelllinie Jeg3 nach Bestrahlung mit 5 Gy mit Hilfe von aktiviertem p53 nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten aber auch, dass dieser Bystander Effekt in Jeg3 Zellen nicht über Gap Junction vermittelt wird. Unabhängig ob in Jeg3 Zellen Gap Junction Kanäle induziert waren oder nicht, konnte ein Bystander Effekt in unbestrahlten Zellen nach einer Kokultur mit direkt bestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Sowohl in Cx43 als auch in Cx26 Transfektanten konnte ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt nachgewiesen werden, der unabhängig von Cx43 und Cx26 Kanälen vermittelt wurde, so dass davon ausgegangen werden muss, dass in Jeg3 Zellen Bystander Effekte über parakrine Mechanismen vermittelt werden.

In den meisten aus der Literatur bekannten Arbeiten werden zur Untersuchung der Rolle von Gap Junction Kanälen bei der Vermittlung von strahlungsinduzierten

Bystander Effekten Gap Junction Inhibitoren wie Carbenoxolone (CBX) oder Lindan eingesetzt. Der Nachteil dieser Inhibitoren ist, dass unerwünschte Effekte, wie z.B. die Zerstörung der Zellmembran und der Membranfluidität oder eine nicht spezifische Inhibition in den Zellen verursacht werden können (Spray et al., 2002). Um diese Effekte zu vermeiden, wurde in dieser Arbeit mit den Doxyzyklin induzierbaren Jeg3 Cx43 und Cx26 Transfektanten gearbeitet, wobei die Cx43 und Cx26 uninduzierten Jeg3 Transfektanten eine interne Kontrolle darstellten.

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie Jeg3 zeigte eindeutig, dass der strahlungsinduzierte Bystander Effekt nicht über Gap Junction Kanäle vermittelt wird. Im Gegensatz dazu konnte in Fibroblasten und Epithelzellen ein Cx43 vermittelter strahlungsinduzierter Bystander Effekt nach Bestrahlung mit α -Teilchen nachgewiesen werden (Azzam et al., 1998; Azzam et al., 2001). Nach Inhibierung der Cx43 Kanäle durch Lindan zeigten diese Zellen keinen Bystander Effekt, so dass davon ausgegangen wird, dass der Bystander Effekt über Gap Junction Kanäle vermittelt wurde (Bishayee et al., 2001; Zhou et al., 2000; Zhou et al., 2001b). Auch in den humanen Hautfibroblastzellen AG1522 konnte gezeigt werden, dass der Bystander Effekt in dieser Zelllinie über Gap Junction vermittelt wurde (Hu et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Beobachtungen von Imaizumi et al. überein. Der Bystander Effekt in einer humanen Lungenkarzinomzelllinie und in einer Ratten Tumorzelllinie wurde nicht über Gap Junction Kanäle vermittelt (Imaizumi et al., 1998; Princen et al., 1999). Yang et al. zeigten, dass in humanen Fibroblasten der Bystander Effekt unabhängig von Gap Junction Kanälen weitergegeben wird (Yang et al., 2005). In dieser Studie wurde neben der Expression von p21 und γ -H2AX Foci, die Bildung von Mikronuklei und die Abnahme der Koloniebildung in Bystander Zellen nach Bestrahlung untersucht.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass erstmalig in dieser Arbeit strahlungsinduzierte Bystander Effekte in Jeg3 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Röntgenstrahlen nachgewiesen werden konnten. Dieser Bystander Effekt ist jedenfalls unter diesen experimentellen Bedingungen unabhängig von Gap Junction Kanälen und auch unabhängig von der Connexin Isoform. Das lässt vermuten, dass der Bystander Effekt in Jeg3 Zellen über parakrine Mechanismen vermittelt wird. Als mögliche Mediatoren des strahlungsinduzierten Bystander Effektes könnten in Jeg3 Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Frage

kommen. Eine Beteiligung von Zytokinen wie TNF (*tumor necrosis factor*), Interleukin 1 und 8 (IL-1, IL-8) und TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) werden diskutiert (Iyer et al., 2000; Lehnert et al., 1997; Matsumoto et al., 2001; Morgan, 2003; Narayanan et al., 1997; Shao et al., 2001; Shao et al., 2005; Shao et al., 2002). ROS sind second messenger, die an einer Vielzahl von zellulären Signaltransduktionswegen und an oxidativen Prozessen in der Tumorentwicklung beteiligt sind (Azzam et al., 2003a; Azzam et al., 2003b; Yang et al., 2005). Zudem wird in einer Arbeit von Zhou et al. berichtet, dass der MAPK Signalweg in normalen, humanen Lungenfibroblasten bei der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten beteiligt ist (Zhou et al., 2005). Es konnte in Gene-Array-Analysen von unbestrahlten Kontrollzellen und Bystander Zellen gezeigt werden, dass Cyclooxygenase-2 (COX-2), das durch MAP-Kinasen aktiviert wird, in unbestrahlten Bystander Zellen um das dreifache erhöht war, als in Kontrollzellen. Der Einsatz von COX-2 Inhibitoren zeigte ebenfalls eine Reduktion des Bystander Signals. Zudem wird die Beteiligung der MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-related kinases*), c-Jnk (*c-Jun-NH₂-terminal kinase*) und p38 an der Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten diskutiert (Dent et al., 2003; Turesson et al., 2003). MAP Kinasen sind auch an der Phosphorylierung von Connexinen beteiligt. Die Phosphorylierung kann kinase-, connexin- und gewebespezifisch erfolgen (Bruzzone et al., 1996). Die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung erfolgt an Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten. Die an der Phosphorylierung beteiligten Kinasen sind: Proteinkinase C (PKC α und PKC ϵ), cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase G (PKG), Tyrosin-Kinasen (z.B. pp60src) und *mitogen-activated* Proteinkinase (MAP-Kinase) (Dhein, 1998; Dhein et al., 2002). Die Sequenz des Cx43 Proteins beinhaltet mehrere Positionen, die von PKA, PKC und MAPK phosphoryliert werden können (Krutovskikh und Yamasaki, 1997). Die Phosphorylierung kann den Öffnungszustand der Kanäle regulieren. Die Phosphorylierung des Ser368-Restes des Cx43 Proteins der Ratte durch PKC führt *in vivo* zur Abnahme der interzellulären Kommunikation (Nicholson et al., 2000).

Die Wirkung der MAP-Kinasen auf die interzelluläre Kommunikation über Gap Junction Kanäle konnte *in vivo* nachgewiesen werden (Warn-Cramer et al., 1998). In wieweit diese MAP-Kinasen Cx43 phosphorylieren und in Jeg3 Zellen bei der

Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten beteiligt sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Die Weitergabe scheint von strahlungsinduzierten Bystander Effekten *in vitro* vom Zelltyp, dem Wachstumszustand der Zellen, der Strahlungsart, der Strahlungs-dosis und dem analysierten Zellmarker abhängig zu sein.

5.4 Bystander Effekte nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen

In einer Kooperation mit der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB) wurden Einzelzellbestrahlungen von parentalen Jeg3 Zellen und Jeg3 Cx43 Transfektanten mit α -Teilchen an einer Mikrostrahlanlage durchgeführt. Die Mikrostrahlanlage ermöglicht die Bestrahlung einzelner Zellen mit einer genau definierten Strahlungs-dosis in einem Monolayer (Folkard et al., 1997a; Folkard et al., 1997b; Nelson et al., 1996; Ponnaiya et al., 2004; Randers-Pehrson et al., 2001). Der Vorteil dabei ist, dass bestrahlte und Bystander Zellen in einem Versuchsansatz gleich behandelt werden. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass jede einzelne bestrahlte Zelle aus einer Zellpopulation Bystander Effekte auslösen kann (Shao et al., 2005). Es können sowohl Zellnuklei als auch das Zytoplasma mit einem Einzelteilchen zielgenau bestrahlt werden, ohne dass die umliegenden, unbestrahlten Zellen vom Strahl getroffen werden. In dieser Arbeit wurden Zellnuklei bestrahlt. Mit der Mikrostrahlanlage der PTB können 50.000 Zellen pro Stunde eingescannt, bestrahlt und die Zellerkennung durchgeführt werden (Frankenberg et al., 2006). Zudem ermöglicht die automatische Auswertung der p53 Immunzytochemie nach Bestrahlung, dass die Ergebnisse objektiv ausgewertet werden können. Weltweit existieren nur wenige Mikrostrahlanlagen oder sind im Aufbau (Folkard et al., 2001). Die bekanntesten Anlagen befinden sich in London (Gray Cancer Institute, England) und in New York (Columbia Universität, USA) (Greif et al., 2004).

Die Ergebnisse der Langzeit Kokulturrexperimente nach Röntgenbestrahlung sollten mit Kurzzeiteffekten nach Einzelzellbestrahlung mit α -Teilchen verglichen werden. Nach Röntgenbestrahlung und einer längeren Kultivierungszeit von vier Stunden konnten strahlungsinduzierte Bystander Effekte, die unabhängig von Gap Junction Kanälen vermittelt werden für Jeg3 Zellen nachgewiesen werden. Nach Bestrahlung mit α -Teilchen konnte auch nach einer kürzeren Kultivierungszeit von 30 min tendenziell ein Gap Junction unabhängiger Bystander Effekt gezeigt werden.

Die Einzelzellbestrahlung erfolgte mit 16 α -Teilchen. Es wurden in jedem Versuchsansatz für jede Zelllinie je 100%, 25% und 0% der Zellen auf einem Bestrahlungsträger bestrahlt. Nach Bestrahlung von 25% der Jeg3 Zellen und der Jeg3 Cx43 Transfektanten, sowohl vor und nach Induktion von Cx43, konnte 30 min nach Bestrahlung mit α -Teilchen tendenziell ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt, der jedoch nicht signifikant war, ermittelt werden. Der Bystander Effekt war unabhängig von der Expression von Cx43 Kanälen, so dass diese Ergebnisse mit den Langzeit Kokulturrexperimenten mit Röntgenstrahlen übereinstimmten.

Ein Bystander Effekt nach Bestrahlung mit α -Teilchen konnte in Zellkulturrexperimenten von Nagasawa und Little beschrieben werden (Nagasawa und Little, 1992). In 20-40% der Chinesischen Hamster Ovar Zellen wurden DNA-Strangbrüche ermittelt, obwohl nur 0,1-1% der gesamten Zellnuklei mit α -Teilchen bestrahlt wurden. In einer anderen Arbeit konnten diese Beobachtungen mit humanen Fibroblasten verifiziert werden (Deshpande et al., 1996). Nach Bestrahlung mit α -Teilchen konnte in humanen Fibroblasten ebenfalls eine Zunahme der Mikronukleibildung, der DNA-Doppelstrangbrüche und Apoptose beobachtet werden (Azzam et al., 2002; Hu et al., 2006; Prise et al., 1998; Shao et al., 2005; Sokolov et al., 2005). DNA-Doppelstrangbrüche waren bereits 2 min nach Bestrahlung mit 1 cGy nachweisbar, wobei 30 min nach Bestrahlung ein Maximum erreicht war (Hu et al., 2006). Je länger die Inkubationszeiten waren, desto mehr Doppelstrangbrüche konnten im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle ermittelt werden. Bystander Zellen zeigten wiederum DNA-Doppelstrangbrüche, die zeitabhängig waren. Je näher die Bystander Zellen an direkt bestrahlten Zellen angrenzten, desto stärker waren die Bystander Effekte. Auch nach Bestrahlung mit α -Teilchen wird bei der Weitergabe von Bystander Effekten Gap Junction Kanälen eine wichtige Rolle zugesprochen (Azzam et al., 1998; Azzam et al., 2001; Mitchell et al., 2004b; Shao et al., 2003b; Shao et al., 2003c). Jedoch wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten nicht ausgeschlossen (Hu et al., 2006). Desweiteren spielen die Strahlungsdosis und die Strahlungsart eine wichtige Rolle (Frankenberg et al., 2006). In den meisten Mikrostrahlexperimenten, sowie auch in dieser Arbeit aufgeführten Einzelzellbestrahlungen, wird der Zellkern bestrahlt. Gleichwohl führt auch die

Bestrahlung des Zytoplasmas mit einer Mikrostrahlanlage zu einer Reaktion auf Bestrahlung (Shao et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bestrahlung der einzelnen Zellkern von Jeg3 und Jeg3 Transfektanten vor und nach Induktion von Cx43 durchgeführt. Wie in den Kokulturrexperimenten wurde p53 als Endpunkt für strahlungsinduzierte Bystander Effekte verwendet. Dabei wurde die Intensität der p53 Immunfärbung gemessen.

Die praktikablen Methoden mussten zunächst noch entwickelt werden. Das Problem der Anheftungsschwierigkeiten der Zellen auf der Biofolie der Bestrahlungsträger konnte durch eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin behoben werden. Die Variation der Gesamtzellzahlen ermöglichte, dass die optimalste Zellzahl für die Bestrahlung und die Zellerkennung ermittelt werden konnte. Die automatische Auswertung der immunzytochemischen Färbung mit p53 wurde durch eine Verbesserung der neu generierten Software von Dr. K. Greif, PTB verbessert und optimiert.

Die Methode zur Durchführung von Einzelzellbestrahlungen wurde im Rahmen dieser Arbeit so weit etabliert, dass in Zukunft Versuche zur Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten durchgeführt werden können. Durch den Vorteil, dass bestrahlte und unbestrahlte Zellen gleichen Kultivierungsbedingungen unterlagen, ermöglichte die Mikrostrahlanlage die Analyse von Bystander Effekten in Jeg3 Zellen und in Jeg3 Cx43 Transfektanten. Dabei stellte sich heraus, dass die Vermittlung von Bystander Effekten in Jeg3 Zellen nicht über Gap Junction Kanäle erfolgt.

6 Zusammenfassung

Obwohl die biologischen Mechanismen von strahlungsinduzierten Bystander Effekten bis heute noch nicht vollständig geklärt sind, wird den interzellulären Gap Junction Kanälen eine bedeutende Rolle für die Vermittlung dieser Effekte zugesprochen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Gap Junction Kanälen bei der Vermittlung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten in Jeg3 Zellen untersucht. Es wurde die kommunikationsdefiziente humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3, die stabil mit dem induzierbaren Cx43 und Cx26 Genen transfiziert wurde, eingesetzt.

Als Vorversuch wurde untersucht, in wie weit die Expression von Cx43 Kanälen durch Röntgenstrahlung in verschiedenen Zelllinien moduliert wurde. Im Vergleich zu den Transfektanten wurden zusätzliche Zelllinien bEnd3 (Maus Endothelzellen) und EA.hy926 (humane Endothelzellen) getestet. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Modulation der Cx43 Expression durch die Bestrahlung zellspezifisch ist und vor der Durchführung von Bystander Experimenten für jede Zelllinie überprüft werden muss. Nach Röntgenbestrahlung wurde in bEnd3 Zellen Cx43 mRNA und Protein hochreguliert. In EA.hy926 Zellen wiederum konnte nach Bestrahlung eine transiente Herunterregulation des Cx43 Transkripts festgestellt werden. Auf Proteinebene waren in EA.hy926 Zellen keine Modulationen nachweisbar. Bei beiden Zelllinien war jedoch keine zusätzliche Steigerung der Kopplung zu detektieren. In Jeg Cx43 Transfektanten war nach Bestrahlung mit 5 Gy weder eine Modulation des exogenen Cx43 noch eine Induktion des endogenen Cx43 weder auf Transkript- noch auf Proteinebene festzustellen.

Um einen geeigneten Stressmarker für die Analyse von strahlungsinduzierten Bystander Effekten zu finden, wurde die Expression von aktiviertem p53, dem Zellzyklusinhibitor p21 und der aktivierten Caspase 3 nach Bestrahlung untersucht. Nur p53 erwies sich als ein guter Marker für die Untersuchung von strahlungsinduzierten Bystander Effekten nach Kokulturrexperimenten, da p53 in direkt bestrahlten Zellen schnell und stabil bis zu 24 h nach Bestrahlung exprimiert wurde.

Die Weitergabe von strahlungsinduzierten Bystander Effekten wurde in dieser Arbeit in Kokulturrexperimenten mit Röntgenstrahlen in einer Dosis von 5 Gy

analysiert. Nach einer vier stündigen Kokultivierung erfolgte die Zellsortierung mittels FACS-Analyse nach bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die Auswertung der p53 Expression in den jeweiligen Populationen ergab einen strahlungsinduzierten Bystander Effekt in Jeg3 Zellen, der unabhängig von Gap Junction Kanälen vermittelt wurde.

Zur Überprüfung von Kurzzeiteffekten und einer anderen Energiequelle nach Bestrahlung wurden an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig (PTB) mit Hilfe einer Mikrostrahl-Anlage einzelne Zellen in einer Zellpopulation mit α -Teilchen bestrahlt. Nach einer 30 minütigen Kokultivierung von direkt bestrahlten und unbestrahlten Zellen auf einem Bestrahlusträger, wurde mit einer speziellen Software die Expression von p53 nach immunzytochemischer Fluoreszenzfärbung automatisch bestimmt. Die Ergebnisse der Einzelzellbestrahlung stimmten tendenziell mit den Ergebnissen der Kokulturexperimente nach Röntgenbestrahlung überein. Auch nach Bestrahlung mit α -Teilchen konnte ein strahlungsinduzierter Bystander Effekt in den unbestrahlten Zellen nachgewiesen werden. Dieser Bystander Effekt wird aber auch nicht über Gap Junction Kanäle vermittelt. Vermutlich werden in Jeg3 Zellen Bystander Effekte über frei diffusionsfähige zelluläre Faktoren an unbestrahlte Zellen weitergegeben, die in weiteren Untersuchungen ermittelt werden müssen.

7 Literaturverzeichnis

Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., and Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8493-8497.

Ai, Z., Fischer, A., Spray, D. C., Brown, A. M., and Fishman, G. I. (2000). Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105, 161-171.

Arnold, S., and Kadenbach, B. (1999). The intramitochondrial ATP/ADP-ratio controls cytochrome c oxidase activity allosterically. *FEBS Lett* 443, 105-108.

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Gooding, T., and Little, J. B. (1998). Intercellular communication is involved in the bystander regulation of gene expression in human cells exposed to very low fluences of alpha particles. *Radiat Res* 150, 497-504.

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Waker, A. J., and Little, J. B. (2000). High and low fluences of alpha-particles induce a G1 checkpoint in human diploid fibroblasts. *Cancer Res* 60, 2623-2631.

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha -particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 473-478.

Azzam, E. I., De Toledo, S. M., Spitz, D. R., and Little, J. B. (2002). Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures. *Cancer Res* 62, 5436-5442.

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2003a). Expression of CONNEXIN43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res* 63, 7128-7135.

Azzam, E. I., de Toledo, S. M., and Little, J. B. (2003b). Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect. *Oncogene* 22, 7050-7057.

Azzam, E. I., and Little, J. B. (2004). The radiation-induced bystander effect: evidence and significance. *Hum Exp Toxicol* 23, 61-65.

Bailey, J., Phillips, R. J., Pollard, A. J., Gilmore, K., Robson, S. C., and Europe-Finner, G. N. (2002). Characterization and functional analysis of cAMP response element modulator protein and activating transcription factor 2 (ATF2) isoforms in the human myometrium during pregnancy and labor: identification of a novel ATF2 species with potent transactivation properties. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1717-1728.

Banaz-Yasar, F., Tischka, R., Iliakis, G., Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2005). Cell line specific modulation of connexin43 expression after exposure to ionizing radiation. *Cell Commun Adhes* 12, 249-259.

- Bates, S., and Vousden, K. H. (1999). Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55, 28-37.
- Beyer, E. C., Paul, D. L., and Goodenough, D. A. (1987). Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol* 105, 2621-2629.
- Bishayee, A., Hill, H. Z., Stein, D., Rao, D. V., and Howell, R. W. (2001). Free radical-initiated and gap junction-mediated bystander effect due to nonuniform distribution of incorporated radioactivity in a three-dimensional tissue culture model. *Radiat Res* 155, 335-344.
- Bratton, S. B., and Cohen, G. M. (2001). Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 22, 306-315.
- Bredesen, D. E. (2000). Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotrauma* 17, 801-810.
- Brenner, D. J., Little, J. B., and Sachs, R. K. (2001). The bystander effect in radiation oncogenesis: II. A quantitative model. *Radiat Res* 155, 402-408.
- Bruzzone, R., White, T. W., and Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238, 1-27.
- Caspar, D. L., Goodenough, D. A., Makowski, L., and Phillips, W. C. (1977). Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J Cell Biol* 74, 605-628.
- Chaudhry, M. A. (2006). Bystander effect: biological endpoints and microarray analysis. *Mutat Res* 597, 98-112.
- Chauhan, D., Pandey, P., Ogata, A., Teoh, G., Krett, N., Halgren, R., Rosen, S., Kufe, D., Kharbanda, S., and Anderson, K. (1997). Cytochrome c-dependent and -independent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem* 272, 29995-29997.
- Cohen-Salmon, M., Ott, T., Michel, V., Hardelin, J. P., Perfettini, I., Eybalin, M., Wu, T., Marcus, D. C., Wangemann, P., Willecke, K., and Petit, C. (2002). Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Curr Biol* 12, 1106-1111.
- Coutts, A. S., and La Thangue, N. (2006). The p53 response during DNA damage: impact of transcriptional cofactors. *Biochem Soc Symp* 73, 181-189.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H., and Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356.
- Cuddihy, A. R., and Bristow, R. G. (2004). The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev* 23, 237-257.
- Czyz, J., Irmer, U., Schulz, G., Mindermann, A., and Hulser, D. F. (2000). Gap-junctional coupling measured by flow cytometry. *Exp Cell Res* 255, 40-46.

- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Lowe, S. W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-2442.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., and Grant, S. (2003). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22, 5885-5896.
- Deshpande, A., Goodwin, E. H., Bailey, S. M., Marrone, B. L., and Lehnert, B. E. (1996). Alpha-particle-induced sister chromatid exchange in normal human lung fibroblasts: evidence for an extranuclear target. *Radiat Res* 145, 260-267.
- Dhein, S. (1998). Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation. *Trends Pharmacol Sci* 19, 229-241.
- Dhein, S., Polontchouk, L., Salameh, A., and Haefliger, J. A. (2002). Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40. *Biol Cell* 94, 409-422.
- Dotto, G. P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 1471, M43-56.
- Echetebe, C. O., Ali, M., Izban, M. G., MacKay, L., and Garfield, R. E. (1999). Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. *Mol Hum Reprod* 5, 757-766.
- Eiberger, J., Kibschull, M., Strenzke, N., Schober, A., Bussow, H., Wessig, C., Djahed, S., Reucher, H., Koch, D. A., Lautermann, J., *et al.* (2006). Expression pattern and functional characterization of connexin29 in transgenic mice. *Glia* 53, 601-611.
- Eichholtz-Wirth, H., and Marx, K. (1998). Clonal variability of radiation-induced cisplatin resistant HeLa cells. *Anticancer Res* 18, 2989-2991.
- Eldadah, B. A., and Faden, A. I. (2000). Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* 17, 811-829.
- Evans, W. H., and Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19, 121-136.
- Ewen, M. E., and Miller, S. J. (1996). p53 and translational control. *Biochim Biophys Acta* 1242, 181-184.
- Fei, P., and El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene* 22, 5774-5783.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Ferrer, I. (1999). Role of caspases in ionizing radiation-induced apoptosis in the developing cerebellum. *J Neurobiol* 41, 549-558.

Fields, S., and Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049.

Folkard, M., Vojnovic, B., Hollis, K. J., Bowey, A. G., Watts, S. J., Schettino, G., Prise, K. M., and Michael, B. D. (1997a). A charged-particle microbeam: II. A single-particle micro-collimation and detection system. *Int J Radiat Biol* 72, 387-395.

Folkard, M., Vojnovic, B., Prise, K. M., Bowey, A. G., Locke, R. J., Schettino, G., and Michael, B. D. (1997b). A charged-particle microbeam: I. Development of an experimental system for targeting cells individually with counted particles. *Int J Radiat Biol* 72, 375-385.

Folkard, M., Schettino, G., Vojnovic, B., Gilchrist, S., Michette, A. G., Pfauntsch, S. J., Prise, K. M., and Michael, B. D. (2001). A focused ultrasoft x-ray microbeam for targeting cells individually with submicrometer accuracy. *Radiat Res* 156, 796-804.

Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S. E., Kapust, R. B., Spillare, E. A., Weinberg, W. C., Felley-Bosco, E., Wang, X. W., Geller, D. A., Tzeng, E., *et al.* (1996). Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2442-2447.

Fournier, C., Wiese, C., and Taucher-Scholz, G. (2004). Accumulation of the cell cycle regulators TP53 and CDKN1A (p21) in human fibroblasts after exposure to low- and high-LET radiation. *Radiat Res* 161, 675-684.

Frankenberg, D., Greif, K. D., and Giesen, U. (2006). Radiation response of primary human skin fibroblasts and their bystander cells after exposure to counted particles at low and high LET. *Int J Radiat Biol* 82, 59-67.

Gartel, A. L., and Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1, 639-649.

Gaugler, M. H. (2005). A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *Br J Radiol Supplement* 27, 100-105.

Geimonen, E., Jiang, W., Ali, M., Fishman, G. I., Garfield, R. E., and Andersen, J. (1996). Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 271, 23667-23674.

Gellhaus, A., Dong, X., Propson, S., Maass, K., Klein-Hitpass, L., Kibschull, M., Traub, O., Willecke, K., Perbal, B., Lye, S. J., and Winterhager, E. (2004). Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* 279, 36931-36942.

Gerardi, S., Galeazzi, G., and Cherubini, R. (2005). A microcollimated ion beam facility for investigations of the effects of low-dose radiation. *Radiat Res* 164, 586-590.

- Gerashchenko, B. I., and Howell, R. W. (2003). Flow cytometry as a strategy to study radiation-induced bystander effects in co-culture systems. *Cytometry A* 54, 1-7.
- Giepmans, B. N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M. M., and Moolenaar, W. H. (2001a). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11, 1364-1368.
- Giepmans, B. N., Verlaan, I., and Moolenaar, W. H. (2001b). Connexin-43 interactions with ZO-1 and alpha- and beta-tubulin. *Cell Commun Adhes* 8, 219-223.
- Glover, D., Little, J. B., Lavin, M. F., and Gueven, N. (2003). Low dose ionizing radiation-induced activation of connexin 43 expression. *Int J Radiat Biol* 79, 955-964.
- Goldberg, Z., and Lehnert, B. E. (2002). Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol* 21, 337-349.
- Gong, X., Agopian, K., Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1999). Genetic factors influence cataract formation in alpha 3 connexin knockout mice. *Dev Genet* 24, 27-32.
- Goodenough, D. A. (1975). The structure of cell membranes involved in intercellular communication. *Am J Clin Pathol* 63, 636-645.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Graeber, T. G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D. E., Koch, C. J., Lowe, S. W., and Giaccia, A. J. (1996). Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379, 88-91.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., and Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54, 4855-4878.
- Greif, K. (2002). Mikro-Ionenstrahl-Apparatur zur Exposition lebender Zellen. Dissertation.
- Greif, K., Brede H. J., Frankenberg D., Giesen U. (2004). The PTB single ion microbeam for irradiation of living cells. *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. B.* 217, 505-512.
- Gros, D. B., and Jongsma, H. J. (1996). Connexins in mammalian heart function. *Bioessays* 18, 719-730.
- Haefliger, J. A., Bruzzone, R., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., and Paul, D. L. (1992). Four novel members of the connexin family of gap junction proteins. Molecular cloning, expression, and chromosome mapping. *J Biol Chem* 267, 2057-2064.

Hall, E. J. (2003). The bystander effect. *Health Phys* 85, 31-35.

Hallan, E., Blomhoff, H. K., Smeland, E. B., and Lomo, J. (1997). Involvement of ICE (Caspase) family in gamma-radiation-induced apoptosis of normal B lymphocytes. *Scand J Immunol* 46, 601-608.

Hamada, N., Kodama, S., Suzuki, K., and Watanabe, M. (2003). Gap junctional intercellular communication and cellular response to heat stress. *Carcinogenesis* 24, 1723-1728.

Hellmann, P., Winterhager, E., and Spray, D. C. (1996). Properties of connexin40 gap junction channels endogenously expressed and exogenously overexpressed in human choriocarcinoma cell lines. *Pflugers Arch* 432, 501-509.

Hickman, A. W., Jaramillo, R. J., Lechner, J. F., and Johnson, N. F. (1994). Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain. *Cancer Res* 54, 5797-5800.

Hu, B., Wu, L., Han, W., Zhang, L., Chen, S., Xu, A., Hei, T. K., and Yu, Z. (2006). The time and spatial effects of bystander response in mammalian cells induced by low dose radiation. *Carcinogenesis* 27, 245-251.

Hutchinson, F. (1985). Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 32, 115-154.

Imaizumi, K., Hasegawa, Y., Kawabe, T., Emi, N., Saito, H., Naruse, K., and Shimokata, K. (1998). Bystander tumoricidal effect and gap junctional communication in lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 205-212.

Iyer, R., and Lehnert, B. E. (2000). Effects of ionizing radiation in targeted and nontargeted cells. *Arch Biochem Biophys* 376, 14-25.

Iyer, R., and Lehnert, B. E. (2002a). Alpha-particle-induced increases in the radioresistance of normal human bystander cells. *Radiat Res* 157, 3-7.

Iyer, R., and Lehnert, B. E. (2002b). Low dose, low-LET ionizing radiation-induced radioadaptation and associated early responses in unirradiated cells. *Mutat Res* 503, 1-9.

Iyer, R., Lehnert, B. E., and Svensson, R. (2000). Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles. *Cancer Res* 60, 1290-1298.

Jiang, J. X., and Goodenough, D. A. (1996). Heteromeric connexons in lens gap junction channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1287-1291.

Jung, M., Zhang, Y., Dimtchev, A., and Dritschilo, A. (1998). Impaired regulation of nuclear factor-kappaB results in apoptosis induced by gamma radiation. *Radiat Res* 149, 596-601.

Kasper, M., Traub, O., Reimann, T., Bjermer, L., Grossmann, H., Muller, M., and Wenzel, K. W. (1996). Upregulation of gap junction protein connexin43 in alveolar

epithelial cells of rats with radiation-induced pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol* 106, 419-424.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.

Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.

Kastan, M. B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316-323.

Kelley, P. M., Abe, S., Askew, J. W., Smith, S. D., Usami, S., and Kimberling, W. J. (1999). Human connexin 30 (GJB6), a candidate gene for nonsyndromic hearing loss: molecular cloning, tissue-specific expression, and assignment to chromosome 13q12. *Genomics* 62, 172-176.

Kelsell, D. P., Dunlop, J., Stevens, H. P., Lench, N. J., Liang, J. N., Parry, G., Mueller, R. F., and Leigh, I. M. (1997). Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature* 387, 80-83.

Kiefer, J. (1993). Problems, pitfalls, perspectives and potentials of quantitative theoretical models for cellular radiation action. *Mutat Res* 289, 27-37.

Knedlitschek, G., Anderer, U., Weibezahn, K. F., and Dertinger, H. (1990). Radioresistance of rat glioma cell lines cultured as multicellular spheroids. Correlation with electrical cell-to-cell-coupling. *Strahlenther Onkol* 166, 164-167.

Krutovskikh, V., and Yamasaki, H. (1997). The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis. *Histol Histopathol* 12, 761-768.

Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

Kwak, B. R., Pepper, M. S., Gros, D. B., and Meda, P. (2001). Inhibition of endothelial wound repair by dominant negative connexin inhibitors. *Mol Biol Cell* 12, 831-845.

Laemmli, U. K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.

Laird, D. W. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta* 1711, 172-182.

Lampe, P. D., and Lau, A. F. (2000). Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215.

Landisman, C. E., Long, M. A., Beierlein, M., Deans, M. R., Paul, D. L., and Connors, B. W. (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 22, 1002-1009.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Lehnert, B. E., Goodwin, E. H., and Deshpande, A. (1997). Extracellular factor(s) following exposure to alpha particles can cause sister chromatid exchanges in normal human cells. *Cancer Res* 57, 2164-2171.

Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A., and Wahl, G. M. (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev* 10, 934-947.

Little, J. B., and Nagasawa, H. (1985). Effect of confluent holding on potentially lethal damage repair, cell cycle progression, and chromosomal aberrations in human normal and ataxia-telangiectasia fibroblasts. *Radiat Res* 101, 81-93.

Littlefield, L. G., Hollowell, J. G., Jr., and Pool, W. H., Jr. (1969). Chromosomal aberrations induced by plasma from irradiated patients: an indirect effect of X radiation. Further observations and studies of a control population. *Radiology* 93, 879-886.

Liu, K., Kasper, M., Bierhaus, A., Langer, S., Muller, M., and Trott, K. R. (1997). Connexin 43 expression in normal and irradiated mouse skin. *Radiat Res* 147, 437-441.

Loewenstein, W. R. (1981). Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 829-913.

Los, M., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 10, 629-639.

Mackay, D., Ionides, A., Kibar, Z., Rouleau, G., Berry, V., Moore, A., Shiels, A., and Bhattacharya, S. (1999). Connexin46 mutations in autosomal dominant congenital cataract. *Am J Hum Genet* 64, 1357-1364.

Makowski, L., Caspar, D. L., Phillips, W. C., and Goodenough, D. A. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol* 74, 629-645.

Marks, N., Berg, M. J., Guidotti, A., and Saito, M. (1998). Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells. *J Neurosci Res* 52, 334-341.

Matsumoto, H., Hayashi, S., Hatashita, M., Ohnishi, K., Shioura, H., Ohtsubo, T., Kitai, R., Ohnishi, T., and Kano, E. (2001). Induction of radioresistance by a nitric oxide-mediated bystander effect. *Radiat Res* 155, 387-396.

Mesnil, M., and Yamasaki, H. (2000). Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Res* 60, 3989-3999.

Michelin, S., del Rosario Perez, M., Dubner, D., and Gisone, P. (2004). Increased activity and involvement of caspase-3 in radiation-induced apoptosis in neural cells precursors from developing rat brain. *Neurotoxicology* 25, 387-398.

Mitchell, S. A., Marino, S. A., Brenner, D. J., and Hall, E. J. (2004a). Bystander effect and adaptive response in C3H 10T(1/2) cells. *Int J Radiat Biol* 80, 465-472.

Mitchell, S. A., Randers-Pehrson, G., Brenner, D. J., and Hall, E. J. (2004b). The bystander response in C3H 10T1/2 cells: the influence of cell-to-cell contact. *Radiat Res* 161, 397-401.

Morgan, W. F. (2003). Is there a common mechanism underlying genomic instability, bystander effects and other nontargeted effects of exposure to ionizing radiation? *Oncogene* 22, 7094-7099.

Mothersill, C., and Seymour, C. (1997a). Lethal mutations and genomic instability. *Int J Radiat Biol* 71, 751-758.

Mothersill, C., and Seymour, C. (1997b). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* 71, 421-427.

Mothersill, C., and Seymour, C. B. (1998). Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes: evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res* 149, 256-262.

Mothersill, C., Lyng, F., Mulford, A., Seymour, C., Cottell, D., Lyons, M., and Austin, B. (2001). Effect of low doses of ionizing radiation on cells cultured from the hematopoietic tissue of the Dublin Bay prawn, *Nephrops norvegicus*. *Radiat Res* 156, 241-250.

Nagasawa, H., and Little, J. B. (1992). Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res* 52, 6394-6396.

Nagasawa, H., Little, J. B., Tsang, N. M., Saunders, E., Tesmer, J., and Strniste, G. F. (1992). Effect of dose rate on the survival of irradiated human skin fibroblasts. *Radiat Res* 132, 375-379.

Nagasawa, H., and Little, J. B. (1999). Unexpected sensitivity to the induction of mutations by very low doses of alpha-particle radiation: evidence for a bystander effect. *Radiat Res* 152, 552-557.

Nagasawa, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., Fuks, Z., and Little, J. B. (2002). Involvement of membrane signaling in the bystander effect in irradiated cells. *Cancer Res* 62, 2531-2534.

Narayanan, P. K., Goodwin, E. H., and Lehnert, B. E. (1997). Alpha particles initiate biological production of superoxide anions and hydrogen peroxide in human cells. *Cancer Res* 57, 3963-3971.

Nelson, J. M., Brooks, A. L., Metting, N. F., Khan, M. A., Buschbom, R. L., Duncan, A., Miick, R., and Braby, L. A. (1996). Clastogenic effects of defined

numbers of 3.2 MeV alpha particles on individual CHO-K1 cells. *Radiat Res* 145, 568-574.

Nicholson, B. J., Weber, P. A., Cao, F., Chang, H., Lampe, P., and Goldberg, G. (2000). The molecular basis of selective permeability of connexins is complex and includes both size and charge. *Braz J Med Biol Res* 33, 369-378.

Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629-643.

Niessen, H., Harz, H., Bedner, P., Kramer, K., and Willecke, K. (2000). Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Sci* 113 (Pt 8), 1365-1372.

Ogryzko, V. V., Wong, P., and Howard, B. H. (1997). WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 17, 4877-4882.

Ohnishi, T., Wang, X., Ohnishi, K., Matsumoto, H., and Takahashi, A. (1996). p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 271, 14510-14513.

Oren, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274, 36031-36034.

Orsino, A., Taylor, C. V., and Lye, S. J. (1996). Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology* 137, 1545-1553.

Osterreicher, J., Prise, K. M., Michael, B. D., Vogt, J., Butz, T., and Tanner, J. M. (2003). Radiation-induced bystander effects. Mechanisms, biological implications, and current investigations at the Leipzig LIPSION facility. *Strahlenther Onkol* 179, 69-77.

Pal, J. D., Berthoud, V. M., Beyer, E. C., Mackay, D., Shiels, A., and Ebihara, L. (1999). Molecular mechanism underlying a Cx50-linked congenital cataract. *Am J Physiol* 276, C1443-1446.

Parsons, W. B., Jr., Watkins, C. H., Pease, G. L., and Childs, D. S., Jr. (1954). Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Cancer* 7, 179-189.

Paul, D. L. (1986). Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. *J Cell Biol* 103, 123-134.

Peracchia, C., Wang, X. G., and Peracchia, L. L. (2000). Chemical gating of gap junction channels. *Methods* 20, 188-195.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.

- Ponnaiya, B., Jenkins-Baker, G., Brenner, D. J., Hall, E. J., Randers-Pehrson, G., and Geard, C. R. (2004). Biological responses in known bystander cells relative to known microbeam-irradiated cells. *Radiat Res* 162, 426-432.
- Princen, F., Robe, P., Lechanteur, C., Mesnil, M., Rigo, J. M., Gielen, J., Merville, M. P., and Bours, V. (1999). A cell type-specific and gap junction-independent mechanism for the herpes simplex virus-1 thymidine kinase gene/ganciclovir-mediated bystander effect. *Clin Cancer Res* 5, 3639-3644.
- Prise, K. M., Belyakov, O. V., Folkard, M., and Michael, B. D. (1998). Studies of bystander effects in human fibroblasts using a charged particle microbeam. *Int J Radiat Biol* 74, 793-798.
- Qu, Y., and Dahl, G. (2002). Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 697-702.
- Randers-Pehrson, G., Geard, C. R., Johnson, G., Elliston, C. D., and Brenner, D. J. (2001). The Columbia University single-ion microbeam. *Radiat Res* 156, 210-214.
- Reagan-Shaw, S., Breur, J., and Ahmad, N. (2006). Enhancement of UVB radiation-mediated apoptosis by sanguinarine in HaCaT human immortalized keratinocytes. *Mol Cancer Ther* 5, 418-429.
- Reinke, V., and Lozano, G. (1997). The p53 targets mdm2 and Fas are not required as mediators of apoptosis in vivo. *Oncogene* 15, 1527-1534.
- Revel, J. P., and Karnovsky, M. J. (1967). Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33, C7-C12.
- Saez, J. C., Martinez, A. D., Branes, M. C., and Gonzalez, H. E. (1998). Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 31, 593-600.
- Sawant, S. G., Randers-Pehrson, G., Geard, C. R., Brenner, D. J., and Hall, E. J. (2001). The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat Res* 155, 397-401.
- Sawant, S. G., Zheng, W., Hopkins, K. M., Randers-Pehrson, G., Lieberman, H. B., and Hall, E. J. (2002). The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival. *Radiat Res* 157, 361-364.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., and Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 254, 439-459.
- Severs, N. J., Coppen, S. R., Dupont, E., Yeh, H. I., Ko, Y. S., and Matsushita, T. (2004). Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res* 62, 368-377.
- Shao, C., Aoki, M., and Furusawa, Y. (2001). Medium-mediated bystander effects on HSG cells co-cultivated with cells irradiated by X-rays or a 290 MeV/u carbon beam. *J Radiat Res (Tokyo)* 42, 305-316.

- Shao, C., Folkard, M., Michael, B. D., and Prise, K. M. (2005). Bystander signaling between glioma cells and fibroblasts targeted with counted particles. *Int J Cancer* 116, 45-51.
- Shao, C., Furusawa, Y., Aoki, M., Matsumoto, H., and Ando, K. (2002). Nitric oxide-mediated bystander effect induced by heavy-ions in human salivary gland tumour cells. *Int J Radiat Biol* 78, 837-844.
- Shao, C., Furusawa, Y., Aoki, M., and Ando, K. (2003a). Role of gap junctional intercellular communication in radiation-induced bystander effects in human fibroblasts. *Radiat Res* 160, 318-323.
- Shao, C., Furusawa, Y., Kobayashi, Y., Funayama, T., and Wada, S. (2003b). Bystander effect induced by counted high-LET particles in confluent human fibroblasts: a mechanistic study. *Faseb J* 17, 1422-1427.
- Shao, C., Stewart, V., Folkard, M., Michael, B. D., and Prise, K. M. (2003c). Nitric oxide-mediated signaling in the bystander response of individually targeted glioma cells. *Cancer Res* 63, 8437-8442.
- Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5, 1707-1711.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9, 1149-1163.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Sohl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228-232.
- Sokolov, M. V., Smilenov, L. B., Hall, E. J., Panyutin, I. G., Bonner, W. M., and Sedelnikova, O. A. (2005). Ionizing radiation induces DNA double-strand breaks in bystander primary human fibroblasts. *Oncogene* 24, 7257-7265.
- Spray, D. C., Rozental, R., and Srinivas, M. (2002). Prospects for rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr Drug Targets* 3, 455-464.
- Suchyna, T. M., Nitsche, J. M., Chilton, M., Harris, A. L., Veenstra, R. D., and Nicholson, B. J. (1999). Different ionic selectivities for connexins 26 and 32 produce rectifying gap junction channels. *Biophys J* 77, 2968-2987.
- Suzuki, M., and Tsuruoka, C. (2004). Heavy charged particles produce a bystander effect via cell-cell junctions. *Biol Sci Space* 18, 241-246.
- Suzuki, M., Zhou, H., Geard, C. R., and Hei, T. K. (2004). Effect of medium on chromatin damage in bystander mammalian cells. *Radiat Res* 162, 264-269.
- Tao, W., and Levine, A. J. (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3077-3080.

Teubner, B., Michel, V., Pesch, J., Lautermann, J., Cohen-Salmon, M., Sohl, G., Jahnke, K., Winterhager, E., Herberhold, C., Hardelin, J. P., *et al.* (2003). Connexin30 (Gjb6)-deficiency causes severe hearing impairment and lack of endocochlear potential. *Hum Mol Genet* 12, 13-21.

Thornberry, N. A. (1997). The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 53, 478-490.

Tomasetto, C., Neveu, M. J., Daley, J., Horan, P. K., and Sager, R. (1993). Specificity of gap junction communication among human mammary cells and connexin transfectants in culture. *J Cell Biol* 122, 157-167.

Topley, G. I., Okuyama, R., Gonzales, J. G., Conti, C., and Dotto, G. P. (1999). p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9089-9094.

Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273, 12725-12731.

Traub, O., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Elfgang, C., Bastide, B., Scheidtmann, K. H., Hulser, D. F., and Willecke, K. (1994). Immunochemical and electrophysiological characterization of murine connexin40 and -43 in mouse tissues and transfected human cells. *Eur J Cell Biol* 64, 101-112.

Trosko, J. E., Chang, C. C., and Madhukar, B. V. (1990). Modulation of intercellular communication during radiation and chemical carcinogenesis. *Radiat Res* 123, 241-251.

Turesson, I., Carlsson, J., Brahme, A., Glimelius, B., Zackrisson, B., and Stenerlow, B. (2003). Biological response to radiation therapy. *Acta Oncol* 42, 92-106.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.

Vousden, K. H. (2000). p53: death star. *Cell* 103, 691-694.

Warn-Cramer, B. J., Cottrell, G. T., Burt, J. M., and Lau, A. F. (1998). Regulation of connexin-43 gap junctional intercellular communication by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 9188-9196.

White, T. W., Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (1998). Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J Cell Biol* 143, 815-825.

Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., *et al.* (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-819.

Wu, L. J., Randers-Pehrson, G., Xu, A., Waldren, C. A., Geard, C. R., Yu, Z., and Hei, T. K. (1999). Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4959-4964.

Yang, H., Asaad, N., and Held, K. D. (2005). Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts. *Oncogene* 24, 2096-2103.

Yu, Y., and Little, J. B. (1998). p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. *Cancer Res* 58, 4277-4281.

Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910-1915.

Zhao, Y., Lu, S., Wu, L., Chai, G., Wang, H., Chen, Y., Sun, J., Yu, Y., Zhou, W., Zheng, Q., *et al.* (2006). Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol Cell Biol* 26, 2782-2790.

Zhou, H., Randers-Pehrson, G., Waldren, C. A., Vannais, D., Hall, E. J., and Hei, T. K. (2000). Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2099-2104.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H., and Hung, M. C. (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3, 245-252.

Zhou, H., Suzuki, M., Randers-Pehrson, G., Vannais, D., Chen, G., Trosko, J. E., Waldren, C. A., and Hei, T. K. (2001b). Radiation risk to low fluences of alpha particles may be greater than we thought. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14410-14415.

Zhou, H., Ivanov, V. N., Gillespie, J., Geard, C. R., Amundson, S. A., Brenner, D. J., Yu, Z., Lieberman, H. B., and Hei, T. K. (2005). Mechanism of radiation-induced bystander effect: role of the cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14641-14646.

Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T. H., and Civitelli, R. (1998). Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 13, 218-228.

Zoidl, G., and Dermietzel, R. (2002). On the search for the electrical synapse: a glimpse at the future. *Cell Tissue Res* 310, 137-142.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Vor- und Zuname	Ferya Banaz-Yaşar
Geburtsdatum	29.12.1974
Geburtsort	Kütahya (Türkei)
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Asthöwerstr. 3 45147 Essen ferya.banaz-yasar@web.de

Schulbildung

1981 - 1985	Städt. Gem. Grundschule Usedomstrasse, Duisburg
1985 – 1994	Abitur an der Gottfried-Wilhelm-Leibniz-Gesamtschule, Duisburg

Studium

1994 - 2002	Studium der Diplom Biologie, Ruhr-Universität, Bochum
1996 - 1998	Lehramtsstudiengang Türkisch/Biologie an der Universität-Gesamthochschule Essen
8/2001 - 5/2002	Diplomarbeit: „Funktionelle Untersuchungen zu Polymorphismen in der Promotorregion des Follikel-stimulierenden Hormon Rezeptors“ , Institut für Reproduktionsmedizin (Direktor Prof. E Nieschlag), Universität Münster
6/2002 - 11/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Zentrum für Innere Medizin, Arbeitsgruppe PD Dr. O.E. Janssen: „Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Morbus Basedow“ , Klinik für Endokrinologie (Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Mann), Universitätsklinikum Essen
11/2003 – 8/2006	Biologie-Doktorandin, Institut für Anatomie, Prof. E. Winterhager: „Einfluss der interzellulären Kommunikation durch Gap Junction Kanäle auf strahlungsinduzierte Bystander Effekte“ , Universitätsklinikum Essen
seit 9/2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anatomie, Prof. S. Ergün, Unversitätsklinikum Essen

8.2 Veröffentlichungen

Ferya Banaz-Yaşar, Klaus Lennartz, Elke Winterhager, Alexandra Gellhaus, ***Radiation-Induced Bystander Effects in Malignant Trophoblast Cells Are Independent From Gap Junctional Communication***, Journal of Cellular Biochemistry 2007, in Druck

Klaus Greif, Wolfgang Beverung, Frank Langner, Dieter Frankenberg, Alexandra Gellhaus, Ferya Banaz-Yaşar, ***The PTB Microbeam: A Versatile Instrument For Radiobiological Research***, Radiat Prot Dosimetry, 2006 Dec 12

Ferya Banaz-Yaşar, Rabea Tischka, George Iliakis, Elke Winterhager, Alexandra Gellhaus, ***Cell line Specific Modulation of Connexin43 Expression after Exposure to Ionizing Radiation***, Cell Communication and Adhesion, 12: 249-259, 2005

Alain Wunsch, Yuni Ahda, Ferya Banaz-Yaşar, Barbara Sonntag, Eberhard Nieschlag, Manuela Simoni, Jörg Gromoll, ***Single-nucleotide polymorphisms in the promoter region influence the expression of the follicle-stimulating hormone receptor***, Fertil Steril 2005; 84: 446-53

8.3 Vorträge

- | | |
|-----------------------|--|
| 6.-8. April 2005 | <u>Ferya Banaz-Yaşar</u> , Rabea Tischka, George Iliakis, Elke Winterhager, Alexandra Gellhaus. <i>Zellspezifische Veränderungen der Connexin43 Expression nach Bestrahlung</i>
8. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung e.V., Buxtehude |
| 05.-07. Dezember 2002 | <u>Ferya Banaz-Yaşar</u> , Beate Quadbeck, Anja Fingerhut, Onno E. Janssen. <i>Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Morbus Basedow</i>
Arbeitstagung experimentelle Schilddrüsenforschung, Berlin |
| 18. Januar 2002 | <u>Ferya Banaz</u> , Volker Blüm, A. La Barbera, Eberhard Nieschlag, Jörg Gromoll. <i>Funktionelle Untersuchungen zu Polymorphismen am FSH-Rezeptor Promoter</i>
7. Jahrestagung der Nordrhein- Westfälischen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie, Köln |

8.4 Posterpräsentationen

- | | |
|-----------------------|--|
| 15.-17. März 2006 | <u>Ferya Banaz-Yaşar</u> , Klaus Lennartz, Klaus-Dieter Greif, Ulrich Giesen, George Iliakis, Elke Winterhager, Alexandra Gellhaus. <i>Evaluation of the role of gap junctional communication in mediating radiation-induced bystander effects in Jeg3 trophoblast cells</i>
7 th International Workshop of Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Columbia University, New York, USA |
| 15.-17. März 2006 | Klaus Greif, <u>Ferya Banaz-Yaşar</u> , Wolfgang Beverung, Frank Langner, Dieter Frankenberg, Alexandra Gellhaus. <i>The PTB Microbeam: A Versatile Instrument for Radiobiological Research</i>
7 th International Workshop of Microbeam Probes of Cellular Radiation Response, Columbia University, New York, USA |
| 13.-18. November 2005 | Klaus Greif, Wolfgang Beverung, Frank Langner, Dieter Frankenberg, <u>Ferya Banaz-Yaşar</u> . <i>The PTB microbeam: a versatile instrument for radiobiological research</i>
14. Internationales Symposium der Microdosimetrie, Venedig, Italien |

- 13.-18. August 2005 Ferya Banaz-Yaşar, Rabea Tischka, George Iliakis, Elke Winterhager, Alexandra Gellhaus. ***Effects of gap junctional communication in mediating bystander effects after irradiation***
Gap Junction Konferenz, Whistler, BC, Canada
19. November 2004 Banaz-Yaşar, F., Tischka, R., Iliakis, G., Winterhager, E., Gellhaus, A. ***Cell specific changes of Connexin43 expression upon radiation in different cell lines***
Poster auf dem Forschungstag des Universitätsklinikums Essen
- 17.-21. April 2004 Susanne Hahn, Ulrich Haselhorst, Ferya Banaz, B.L. Herrmann, Klaus Mann, Onno E. Janssen. ***Der Proinsulin/Insulin-Quotient ist bei nicht insulinresistenten Patientinnen mit polyzystischem Ovarsyndrom erhöht***
Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
- 17.-21. April 2004 Susanne Hahn, U. Frey, W. Siffert, Ferya Banaz, Beate Quadbeck, Klaus Mann, Onno E. Janssen. ***Der T393C Polymorphismus des GNAS1 Gens beeinflusst die Gewichtsabnahme und Insulinresistenz bei Metformin-behandelten PCOS Patientinnen***
Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
2. Preis des Young Investigators' Award 2004
- 03.-06. März 2004 Alain Wunsch, Ferya Banaz-Yaşar, Manueal Simoni, Jörg Gromoll. ***The expression of the follicle-stimulating hormone receptor is influenced by single-nucleotide polymorphisms in the promoter region***
48. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Dresden
18. Juli 2003 F. Banaz-Yaşar, B. Quadbeck, J. Küppers, A. Fingerhut, J. Klein, M. Walz, K. Mann, O. E. Janssen. ***Veränderungen der extrazellulären Matrix bei Morbus Basedow***
Poster auf dem Forschungstag des Universitätsklinikums Essen
- 19.-22. Juni 2003 Ferya Banaz-Yaşar, Beate Quadbeck, Julia Küppers, Anja Fingerhut, Jaqueline Klein, M. Walz, Klaus Mann, Onno E. Janssen. ***Extracellular Matrix Rearrangement in Graves' Disease***
Jahrestagung der Endocrine Society Philadelphia, USA
- 07.-08. März 2003 Ferya Banaz-Yaşar, Beate Quadbeck, Julia Küppers, Anja Fingerhut, Jaqueline Klein, M. Walz, Klaus Mann, Onno E. Janssen. ***Expression von Proteinasen und Proteinase-Inhibitoren beim Morbus Basedow***
47. Symposion der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie, Köln

Essen, 24. September 2006

Ferya Banaz-Yaşar

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Einfluss der interzellulären Kommunikation durch Gap Junction Kanäle auf strahlungsinduzierte Bystander Effekte“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Ferya Banaz-Yaşar befürworte.

Essen, 24. September 2006

Prof. Dr. E. Winterhager

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 24. September 2006

Ferya Banaz-Yaşar

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 24. September 2006

Ferya Banaz-Yaşar